



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



Facultad de Química

Maestría en Ciencias Ambientales

**Inmunotoxicidad y estrés oxidativo en agricultores expuestos
crónicamente a plaguicidas en Calimaya, Estado de México.**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestra en Ciencias Ambientales

P R E S E N T A

Helen's Irais Sánchez Mendoza

Comité de tutores: Dra. Araceli Amaya Chávez
Dra. María del Socorro Camarillo Romero
Dr. Juan Carlos Sánchez Meza

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO DICIEMBRE DE 2019



Este trabajo se desarrolló en Calimaya, municipio del Estado de México con el consentimiento de los individuos participantes y las autoridades del H. Ayuntamiento de Calimaya. Previa autorización del comité de ética e investigación del Centro de Investigaciones en Ciencias Médicas, actualmente Clínica Multidisciplinaria de Salud, de la Universidad Autónoma del Estado de México.

El proyecto se realizó en las instalaciones de la Facultad de Química de la UAEMex bajo la dirección académica de la Dra. Araceli Amaya Chávez, Dra. María del Socorro Camarillo Romero y el Dr. Juan Carlos Sánchez Meza. Asimismo, se recibió apoyo de la Universidad Autónoma de México con el proyecto de investigación 4538/2018/CI.W.

Agradecimientos

- A la Universidad Autónoma del Estado de México por brindarme la oportunidad de formar parte del programa de Maestría en Ciencias Ambientales ofertado por la Facultad de Química. Asimismo, por permitirme desarrollar el presente proyecto en sus instalaciones y brindarme todos los recursos a su alcance para la consecución del mismo.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención que me permitió desarrollar la presente investigación.
- Un agradecimiento al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la beca de apoyo a la titulación de posgrado.
- Le agradezco el apoyo brindado para la elaboración de este trabajo al H. Ayuntamiento de Calimaya, la Dirección de Desarrollo Económico, Fomento Agropecuario y Turístico, así como de los delegados de las comunidades de Santa María Nativitas y Zaragoza de Guadalupe que cooperaron para el desarrollo de este proyecto de investigación.
- Un especial agradecimiento para la Dra. en C. Araceli Amaya Chávez por sus valiosas aportaciones en la realización de este trabajo y por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Su valiosa orientación y consejos me permitieron concluir satisfactoriamente este proyecto.
- Un agradecimiento para la Dra. María del Socorro Camarillo Romero y el Dr. Juan Carlos Sánchez Meza, quienes fungieron como mis tutores, aportando sus conocimientos a este trabajo.
- A todas las personas que me apoyaron para la consecución de esta Maestría.

Dedicatorias

- Este trabajo está dedicado al Dios que se manifiesta en todas las cosas del universo y no al Dios que se preocupa por el destino de los hombres.
- Al amor de mi vida, quien ha hecho de mi vida una maravillo experiencia. Te amo.
- A mi gordito precioso, quien será por siempre mi mejor regalo de la vida.
- A mi mamá y mi Enano por su apoyo incondicional y el amor que siempre me ha brindado.

Índice

<i>Agradecimientos</i>	<i>III</i>
<i>Dedicatorias</i>	<i>IV</i>
<i>Índice de figuras</i>	<i>VII</i>
<i>Índice de tablas</i>	<i>VIII</i>
<i>Resumen</i>	<i>IX</i>
<i>1. Marco teórico</i>	<i>1</i>
<i>1.1. Plaguicidas</i>	<i>1</i>
<i>1.1.1. Clasificación de los plaguicidas</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2. Contaminación ambiental por plaguicidas</i>	<i>4</i>
<i>1.2. Toxicología de plaguicidas</i>	<i>5</i>
<i>1.2.1. Toxicocinética de los plaguicidas</i>	<i>6</i>
<i>1.2.2. Toxicodinamia de los plaguicidas</i>	<i>7</i>
<i>1.3. Efectos en humanos por exposición a plaguicidas</i>	<i>8</i>
<i>1.4. Biomarcadores</i>	<i>10</i>
<i>2. Antecedentes</i>	<i>12</i>
<i>2.1. Estrés oxidativo por plaguicidas</i>	<i>12</i>
<i>2.2. Inmunotoxicidad por plaguicidas</i>	<i>14</i>
<i>2.2.1. Carbamatos (CB)</i>	<i>16</i>
<i>2.2.2. Organofosforados (OF)</i>	<i>17</i>
<i>2.2.3. Organoclorados (OC)</i>	<i>17</i>
<i>2.2.4. Piretroides (Py)</i>	<i>18</i>
<i>2.3. Planteamiento del problema</i>	<i>19</i>
<i>2.3.1. Uso de plaguicidas en la agricultura en la zona protegida de la fauna y flora del nevado de Toluca, zona: Calimaya, Estado de México</i>	<i>19</i>
<i>2.4. Justificación</i>	<i>20</i>
<i>2.5. Hipótesis</i>	<i>21</i>
<i>2.6. Objetivos</i>	<i>21</i>
<i>2.6.1. Objetivo general</i>	<i>21</i>
<i>2.6.2. Objetivos específicos</i>	<i>21</i>
<i>3. Metodología</i>	<i>22</i>
<i>3.1. Metodología</i>	<i>22</i>
<i>3.1.1. Diseño de estudio</i>	<i>22</i>
<i>3.1.2. Universo de trabajo</i>	<i>22</i>
<i>3.1.2.1. Gestión</i>	<i>22</i>
<i>3.1.2.2. Ética del estudio</i>	<i>23</i>
<i>3.1.3. Método de muestreo y tamaño de muestra</i>	<i>23</i>
<i>3.1.4. Operacionalización de las variables</i>	<i>25</i>

3.1.5.	<i>Criterios de inclusión, exclusión y eliminación</i>	26
3.1.5.1.	<i>Criterios de Inclusión</i>	26
3.1.5.2.	<i>Criterios de exclusión</i>	26
3.1.5.3.	<i>Criterios de Eliminación</i>	26
3.1.6.	<i>Procedimiento</i>	27
3.1.6.1.	<i>Toma de muestra, transporte y preparación</i>	27
3.1.6.2.	<i>Determinación de biometría hemática</i>	28
3.1.6.3.	<i>Determinación de biomarcadores de inmunotoxicidad</i>	28
3.1.6.4.	<i>Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo.</i>	30
3.1.7.	<i>Análisis estadístico de resultados</i>	32
4.	<i>Resultados</i>	33
4.1.	<i>Resultados</i>	33
4.1.1.	<i>Análisis descriptivo</i>	33
4.1.1.1.	<i>Características de la población de estudio</i>	33
4.1.1.2.	<i>Historia clínica: factores de riesgo y antecedentes inmunológicos</i>	34
4.1.1.3.	<i>Estado de salud de la población: Exploración física, antropometría y toma de signos vitales</i>	36
4.1.1.4.	<i>Historia laboral: Población Ocupacionalmente Expuesta</i>	38
4.1.2.	<i>Biometría hemática</i>	39
4.1.3.	<i>Biomarcadores de estrés oxidativo: Enzimas antioxidantes</i>	41
4.1.4.	<i>Inmunoglobulinas</i>	42
5.	<i>Discusión y conclusiones</i>	44
5.1.	<i>Discusión</i>	44
5.2.	<i>Conclusiones</i>	47
6.	<i>Artículo</i>	49
6.1.	<i>Immunological and oxidative stress biomarkers in farmers occupationally exposed to pesticides in a Mexican Flora and Fauna Protection Area.</i>	49
7.	<i>Referencias bibliográficas</i>	69
	<i>ANEXO A. Carta de consentimiento informado</i>	82
	<i>ANEXO B. Historia clínico-laboral</i>	85
	<i>ANEXO C. Oficio institucional de permiso del H. Ayuntamiento de Calimaya</i>	89

Índice de figuras

Figura 1 Mecanismos de transporte de los plaguicidas (elaboración propia)	4
Figura 2 Diagrama de flujo de la metodología de investigación realizada en este proyecto.	27
Figura 3 Diagrama de flujo de la determinación de la concentración de inmunoglobulinas.	30
Figura 4 Esquematización de la reacción enzimática de la actividad de la Superóxido Dismutasa	31
Figura 5 Esquematización de la reacción enzimática de la actividad de la Catalasa	31
Figura 6 Nivel socioeconómico	35
Figura 7 Enfermedades presentes en los grupos de estudio; GT (a) y POE (b)	36
Figura 8 Distribución del Índice de Masa Corporal de la población de estudio	37
Figura 9 Uso de plaguicidas por agricultores participantes en la investigación en Calimaya, Estado de México	39
Figura 10 Biomarcadores de estrés oxidativo del GT y la POE	41

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad	2
Tabla 2 Clasificación de los plaguicidas según su vida media.	2
Tabla 3 Clasificación de los plaguicidas, según la familia química.	3
Tabla 4 Operacionalización de las variables	25
Tabla 5 Características de los grupos de estudio	34
Tabla 6 Antropometría y toma de signos vitales en la población de estudio	37
Tabla 7 Resultados de la biometría hemática de la población de estudio	40
Tabla 8 Resultados de inmunoglobulinas en las poblaciones de estudio	42
Tabla 9. Relación lineal de los biomarcadores con el tiempo de exposición del grupo POE.	43

Resumen

Aledaños a la zona protegida del Nevado de Toluca, Estado de México existen diez municipios, destacando Calimaya entre los primeros tres lugares por su alta producción agrícola, empleando con poca regulación y monitoreo distintos tipos de plaguicidas, lo que provoca una exposición crónica de los trabajadores y de la población circunvecina. Se ha probado que estos compuestos pueden generar estrés oxidativo, neurotoxicidad, inmunotoxicidad, entre otros. Este trabajo tuvo por objetivo evaluar la Inmunotoxicidad y el estrés oxidativo en células sanguíneas en los agricultores de esta localidad. Participaron los agricultores y a la población de Calimaya, se les aplicó cuestionarios con el propósito de conocer sus características generales, estado de salud, nivel socioeconómico y grado de exposición a plaguicidas, los voluntarios firman una carta de consentimiento informado y se les toma una muestra de sangre. Se realizó biometría hemática, inmunoglobulinas IgG, IgE y IgM, actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa) y niveles de lipoperoxidación (biomarcadores de estrés oxidativo).

En este estudio se analizó el estado de salud, de 78 voluntarios sanos (grupo testigo) y 73 agricultores ocupacionalmente expuestos (POE) a plaguicidas del municipio de Calimaya. Los resultados muestran en el grupo POE, individuos con alteraciones del tracto respiratorio superior (rinitis, faringitis) y conjuntivitis asociado a una exposición de mezcla de plaguicidas predominando Atrazina y 2,4-D (Costa et al., 2013; Kim, Kabir, & Jahan, 2017). De la Biometría hemática, solo los valores de las bandas de neutrófilos fueron mayores en relación con los valores del grupo testigo. La actividad enzimática de SOD y CAT, en este grupo, fue mayor significativamente ($p < 0.05$, U Mann-Whitney). En cuanto a los niveles de peroxidación lipídica hubo una tendencia a ser mayores, sin ser significativos ($p = 0.167$).

Con respecto a las inmunoglobulinas, se encontraron resultados por arriba de los valores de referencia, asimismo superior a los obtenidos en el grupo testigo para IgG e IgE ($p < 0.05$, U Mann-Whitney) no así para IgG. Además, se encontró que hay una asociación significativa, aunque baja, (correlación de Spearman) entre los valores de IgE, la antigüedad laboral y las sintomatologías descritas anteriormente ($p < 0.05$). Los resultados sugieren un aumento en el estrés oxidativo en la POE, con una respuesta adaptativa del sistema antioxidante, que son efectos tóxicos que pueden atribuirse a la exposición a plaguicidas. Además, la exposición a plaguicidas en la POE se asocia en un aumento de efectos nocivos a la salud.

CAPÍTULO 1

1. Marco teórico

1.1. Plaguicidas

Son sustancias o mezclas de sustancias cuyas funciones son prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, que causan perjuicio o que interfieren en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de productos agrícolas incluyendo los vectores de enfermedades humanas, insectos, arácnidos u otros animales. (Bakırcı et al., 2014; FAO, 2016).

1.1.1. Clasificación de los plaguicidas

Los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su efecto biológico (Ramírez y Lacasaña, 2001). La Organización Mundial de la Salud estableció una clasificación basada en su grado de toxicidad aguda (Tabla 1), la cual está definida como la capacidad del plaguicida de producir un daño a la salud a través de la exposición en un período de tiempo corto (OPS/OMS, 2002).

La toxicidad de un plaguicida se mide a través de la dosis letal media (DL₅₀) o de la concentración letal media (CL₅₀). Dichos factores varían conforme a múltiples características como la concentración del producto, la vía de absorción, la temperatura, así como las características propias del ser humano (Jaramillo, Martelo, & Duarte, 2013).

Tabla 1 Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad

Clase	Toxicidad	Oral DL ₅₀	Ejemplos
IA	Extremadamente peligrosos	<5	Paratión, dieldrín
IB	Altamente peligrosos	5 – 50	Eldrín, dicloros
II	Moderadamente peligrosos	>50 – 2000	DDT, clordano
III	Ligeramente peligrosos	>2000 – 5000	Malatión

(World Health Organization & International Programme on Chemical Safety, 2010)

Por su vida media, los plaguicidas se clasifican en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (Tabla 2). Dentro de esta clasificación es importante conocer los siguientes términos:

- **Persistencia.** Capacidad de una sustancia o un compuesto, de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que ha cumplido el objetivo por el cual se aplicó (Ramírez y Lacasaña, 2001).
- **Vida media.** Lapso de tiempo necesario para que se degrade la mitad de la concentración del compuesto o mezcla aplicada (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Tabla 2 Clasificación de los plaguicidas según su vida media.

Persistencia	Vida media	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico

(Jayaraj, Megha, & Sreedev, 2016)

De acuerdo con su estructura química, los plaguicidas se clasifican en diversas familias, que incluyen desde los compuestos organoclorados y organofosforados hasta compuestos inorgánicos. En la Tabla 3 se muestran los principales plaguicidas de acuerdo con su estructura química. Los organoclorados (OC) y organofosforados (OF) son los plaguicidas más ampliamente utilizados en la agricultura (Del Puerto, Suárez y Palacio, 2014). La estructura química de los OC corresponde a la de los hidrocarburos clorados, lo que les confiere una alta estabilidad física y química (~Vida media de más de 5 años), haciéndolos insolubles en agua, no volátiles y altamente solubles en disolventes orgánicos. Sus metabolitos son contaminantes de varios tejidos principalmente tejido adiposo en humanos y de mamíferos en general (Shapiro et al., 2016).

Los compuestos organofosforados (OF), son ésteres, amidas o tioles derivados de los ácidos fosfórico. Se degradan por oxidación e hidrólisis, dando origen a productos solubles en agua, tentativamente menos persistentes y poco acumulables en el organismo humano (Jaramillo, Martelo y Duarte, 2013). Los carbamatos (C) son otro grupo de plaguicidas que pueden ser de tres tipos principales: derivados de ésteres carbamatados, derivados del ácido tiocarbámico y carbamatos propiamente dichos. Su degradación se realiza por oxidación y sus metabolitos finales son hidrosolubles, cuentan con un corto tiempo de persistencia ambiental (Quijano, Portilla y Quijano, 2016).

Tabla 3 Clasificación de los plaguicidas, según la familia química.

Familia química	Ejemplos
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán
Organofosforados	Bromophos, diclorvos, malatión
Carbamatos	Carbaryl, methomyl, propoxur
Tiocarbamatos	Mancozeb, maneb
Piretroides	Cipermetrina, permetrina
Derivados bipiridilos	Diquat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Picloram, silvex
Derivados del cloronitrofenólicos	Dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazina, desmetrina
Compuestos orgánicos del estaño	Cyhexatin, plictran
Compuestos inorgánicos	Obpa, arsenato de plomo

Compuestos de origen botánico	Nicotina, aceite de canola
-------------------------------	----------------------------

(Ramírez & Lacasaña, 2001)

1.1.2. Contaminación ambiental por plaguicidas

A partir del siglo XX, el incremento de la población mundial trajo como consecuencia una alta demanda alimentaria, para lo cual el sector agrícola incremento su producción, así como la necesidad de emplear plaguicidas que permitan un mayor rendimiento de los cultivos. Los plaguicidas cumplen con su principal función en la agricultura, sin embargo, su uso de forma indiscriminada y sin regulación produce grandes cantidades de residuos peligrosos que se distribuyen en todos los medios ambientales (suelo, agua, aire y biota), amenazando los sistemas abióticos y bióticos, esto último incluyendo a especies vitales de la cadena trófica y a los seres humanos (Del Puerto et al., 2014; García & Rodríguez, 2012).

Los plaguicidas no permanecen inertes en su sitio de emisión, se encuentran en constante movimiento. Los diversos mecanismos de transporte de los plaguicidas (Figura 1) les permiten contaminar de manera global el ambiente, ya sea de forma individual o en complejas mezclas que pueden formar subproductos más tóxicos que el compuesto original, por ejemplo: el paratión cuyo metabolito activo es el paraoxón que es mucho más tóxico que el paratión. El destino y distribución de los plaguicidas depende de los mecanismos de transporte (difusión, dispersión, precipitación), los que a su vez se ven influenciados por las características de la sustancia.

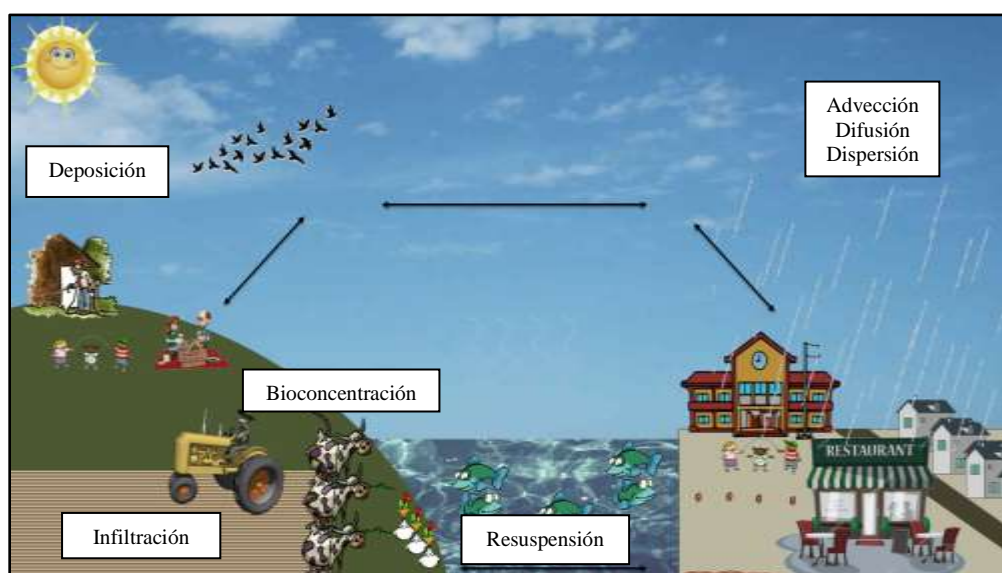


Figura 1 Mecanismos de transporte de los plaguicidas (elaboración propia)

Algunos de los plaguicidas que tiene altos riesgos de efectos nocivos al ambiente y seres vivos, están prohibidos o rigurosamente restringidos por convenios internacionales, como el Convenio de Estocolmo sobre los Compuestos Orgánicos Persistentes (COP), que entró en vigor en mayo de 2004 y abarcaba inicialmente 12 productos químicos, aumentado paulatinamente hasta un total de 37 COP registrados en junio de 2017, de los cuales 22 son plaguicidas. En México, 17 de ellos no deben ser utilizados, 1 se encuentra restringido y 4 de ellos están sujetos a requisitos establecidos en el convenio de Estocolmo (Alatorre et al., 2016; Stockholm Convention, 2017).

Una de las características importantes para la restricción de los plaguicidas es la persistencia. Los plaguicidas orgánicos persistentes (POP) tienen una vida media de 19 meses a 20 años, lo que les permite permanecer estables en el ambiente dispersándose fácilmente. Poseen alta liposolubilidad, se acumulan en el tejido graso de los seres vivos, lo que propicia su biomagnificación a través de la cadena trófica. El último eslabón de la cadena alimenticia son los seres humanos, incrementando el riesgo de efectos nocivos a la salud por la exposición alimenticia a dichos compuestos. Otras vías de absorción importantes son la inhalación y el contacto dérmico.

1.2. Toxicología de plaguicidas

La Toxicología es la ciencia que se encarga del estudio de los efectos adversos asociados a la exposición de productos tóxicos. El término exposición hace referencia a las concentraciones o cantidad de una sustancia que entra en contacto con los individuos o las poblaciones de un lugar y tiempo determinado (Degrossi, 2013).

Reportes de la OMS muestran que anualmente a nivel mundial, hay aproximadamente un millón de intoxicaciones accidentales y dos millones de intoxicaciones provocadas con plaguicidas, de las cuales aproximadamente 200,000 terminan en la muerte (WHO, 2016). Debido a la alta morbilidad por exposición a plaguicidas, se puede afirmar que estamos frente a un problema de salud ambiental, el cual puede ocurrir en diferentes escenarios como el ocupacional, ambiental y domiciliario. Los plaguicidas pueden entrar en contacto con el hombre por alimentos, agua, aire y otros dependiendo de las características fisicoquímicas de la sustancia, a través de las vías de absorción como inhalación, ingestión vía dérmica entre otros (Magnarelli, 2015a).

1.2.1. Toxicocinética de los plaguicidas

La toxicocinética comprende cuatro fases: *absorción*, *distribución*, *biotransformación* y *eliminación*. (Steven, 2012).

Absorción. Se define como el proceso por medio del cual un tóxico atraviesa membranas y capas de células hasta llegar al torrente sanguíneo, este proceso se ve afectado por la vía de exposición, concentración de la sustancia en el sitio de absorción, características fisiológicas propias del individuo (pH, flujo sanguíneo, enzimas, entre otros), así como las propiedades fisicoquímicas de la sustancia (pH, coeficiente de reparto octanol-agua, pKa). La membrana celular es vulnerable a las sustancias liposolubles que logran atravesarla con facilidad.

Algunos plaguicidas poseen la característica de lipofilicidad ingresando al ser humano por cualquiera de las vías: cutánea, respiratoria y digestiva. Las dos primeras constituyen las rutas más comunes de penetración en intoxicaciones laborales y la última es más frecuente en las de origen intencional o accidental (WHO, 2016). La lipofilicidad de los plaguicidas depende en gran medida de su coeficiente de partición octano-agua, el cual al ser más alto facilita su absorción en las membranas lipídicas, ejemplo plaguicidas organoclorados (Waliszewski et al., 2015).

Distribución. Se refiere al desplazamiento de la sustancia desde el sitio de absorción hasta otros tejidos en el organismo. Es un proceso dinámico que depende del flujo sanguíneo de los diferentes tejidos y la afinidad de los plaguicidas a estos. La sangre es el principal vehículo de transporte de los compuestos tóxicos y sus metabolitos. Las sustancias se pueden distribuir de diversas maneras, disolviéndose físicamente en el plasma en estado libre o uniéndose a uno o varios tipos de proteínas plasmáticas.

El volumen de distribución es la cantidad de una sustancia en un tiempo determinado dividida entre la concentración en el fluido corporal (sangre, plasma o suero). Un volumen <1 L/kg de peso corporal indica una distribución preferencial en la sangre, mientras que valores >1 L/kg indican una preferencia por los tejidos periféricos. La distribución depende de la fisiología del individuo y de las propiedades de los compuestos (Degrossi, 2013; Silbergeld, 1998).

Biotransformación. Es la conversión metabólica de los xenobióticos. Por regla general, el metabolismo convierte los xenobióticos liposolubles en metabolitos hidrosolubles, los cuales pueden excretarse con facilidad. De manera general el proceso de biotransformación de los

plaguicidas es a través de las enzimas microsomaes hepáticas, tras lo cual pueden conformarse metabolitos inocuos, o incluso más tóxicos que el compuesto principal como es el caso del malatión (Waliszewski et al., 2015).

Una velocidad de biotransformación baja de un compuesto tóxico lipofílico tiene por lo general como consecuencia su acumulación en los tejidos corporales, como en el caso de los organoclorados, a diferencia de los plaguicidas de tipo piretroides los cuales son biotransformados con gran rapidez por las esterasas y oxidasas microsomaes hepáticas formando metabolitos polares, facilitando su eliminación y aumentando la excreción por vía renal (U.S. Department of Health and Human Services, 2017).

Eliminación. Depende de todo el proceso previamente comentado. En el pulmón, el proceso de absorción-eliminación se inicia inmediatamente con el aire espirado. La eliminación por otras rutas es un proceso prolongado y se inicia posterior a su distribución y/o biotransformación. La concentración del plaguicida en la sangre se reduce tras la excreción a través de los mismos mecanismos (renal, digestivo, fluidos corporales) que tiene el organismo para excretar los desechos metabólicos endógenos.

La vía de eliminación de los plaguicidas depende tanto de sus características fisicoquímicas, como fisiológicas del individuo expuesto. La eliminación urinaria es una vía común de los piretroides y organofosforados, de estos últimos su eliminación es en menor medida a través del sistema digestivo y respiratorio, los organoclorados tiene alta eliminación por vía seno materno (Waliszewski et al., 2015).

1.2.2. Toxicodinamia de los plaguicidas

La toxicodinamia es el estudio del mecanismo de acción de una sustancia por interacción molecular con los sistemas biológicos de un organismo. El mecanismo a través del cual producen toxicidad los organofosforados y carbamatos se asocia con la inhibición de la acetil-colinesterasa (ACh), lo que genera acumulación de la acetilcolina alterando el funcionamiento normal del impulso nervioso (U.S. Department of health and human services, 2003).

En cuanto a los organoclorados su efecto tóxico es interfiriendo con el flujo de iones a través de las membranas de las células nerviosas y aumentando de esta forma la irritabilidad de las neuronas, característica de acción que comparten con los piretroides, pues el mecanismo de

acción de estos últimos es por medio de la prolongación de la permeabilidad de iones sodio y/o cloro persistiendo la despolarización de la membrana con impulsos nerviosos continuos (Burns & Pastoor, 2018).

1.3. Efectos en humanos por exposición a plaguicidas

La exposición a plaguicidas es un problema de salud ambiental puede ocurrir en tres diferentes escenarios: la exposición ocupacional, ambiental y alimentaria de la población general (Magnarelli, 2015b). En los tres escenarios planteados, los plaguicidas pueden entrar en contacto con el hombre a través de todas las vías de absorción posibles mencionadas previamente, dependiendo de las características fisicoquímicas de la sustancia; en el aire, en los alimentos y dérmico al contacto directo o con algún medio ambiente contaminado.

Los plaguicidas pueden ocasionar tanto efectos agudos como crónicos en la salud. Los efectos agudos se presentan 24-48 horas posteriores a la exposición, la cual es de corta duración a concentraciones altas. Los efectos crónicos son manifestaciones por exposición a dosis bajas por tiempo prolongado. Para el caso de los seres humanos se considera como una exposición por 12 meses o más (Mostafalou & Abdollahi, 2013; Pérez-Zamora, Shejet, & López-Portillo, 2016). En ambos casos los efectos pueden ser graves e irreversibles, incluso llegar a la muerte.

La toxicidad de los plaguicidas se puede expresar como: 1) Toxicidad oral aguda: ingestión de una dosis alta de un plaguicida, que causa efectos tóxicos en un ser vivo. 2) Toxicidad dérmica: debida al contacto y absorción del plaguicida por la piel. 3) Toxicidad por inhalación: se produce al respirar una atmósfera (nebulización, rociamiento o atomización) contaminada por el plaguicida. 4) Toxicidad crónica: se refiere a la exposición con dosis variadas y repetidas a lo largo del tiempo del producto tóxico (Del Puerto et al., 2014; Di Leo, Bonel, & Montico, 2015).

La toxicidad puede ser única o múltiple, por lo que el diagnóstico presenta una especial dificultad. Además, los productos comerciales están conformados por múltiples ingredientes que ejerce su acción tóxica de forma individual y colectiva (potenciación, inhibición). La correlación entre exposición y efecto de forma crónica es difícil debido a las circunstancias previamente descritas, aunado al desconocimiento de los mecanismos de acción de algunos plaguicidas.

Los efectos agudos por plaguicidas inhibidores de acetil colinesterasa pueden ser muscarínicos, nicotínicos y del sistema nervioso central, presentando visión borrosa, miosis, rinorrea, vómito y

fasciculaciones, entre otros. Algunos efectos crónicos por exposición a mezclas plaguicidas son: aumento de riesgo de cáncer, alteraciones en los mecanismos antioxidantes, afección del sistema endocrino, efectos reproductivos, inmunotoxicidad y neurotoxicidad, entre otros. Los estudios toxicológicos de plaguicidas en animales y en el hombre indican que se trata de sustancias tóxicas y poseen un potencial efecto promotor, coadyuvando a la carcinogénesis (Dhouib et al., 2016; Magnarelli, 2015a; Mokarizadeh et al., 2015; Saadi & Abdollahi, 2012)

En cuanto a la neurotoxicidad, se conocen los efectos neurotóxicos agudos y subagudos de la intoxicación por plaguicidas (organofosforados, carbamatos) como son el síndrome nicotínico y el síndrome del sistema nervioso central, entre otros (University of Herfordshire, 2017). Actualmente se han descrito alteraciones transitorias, en determinadas áreas de la esfera afectiva, así mismo déficit en la memoria, destreza psicomotriz y capacidad de abstracción, funciones en las que están implicados tanto el sistema nervioso central como el periférico, entre otros (Mostafalou & Abdollahi, 2013; Muñoz-Quezada et al., 2016; Suarez-Lopez et al., 2013).

Reportes en la literatura, han asociado la exposición a plaguicidas con daño teratogénico y mutagénico, que pueden resultar de la exposición a plaguicidas de cualquier progenitor antes de la concepción, de la exposición de la madre durante el periodo gestacional o de exposiciones posteriores al nacimiento, durante la maduración sexual (Ezequiel et al., 2015; Magnarelli, 2015a; Schaalán, Abdelraouf, Mohamed, & Hassanein, 2017).

Uno de los efectos tóxicos producido por los plaguicidas, que resulta de interés para su estudio en este trabajo, es el que se refiere a los efectos sobre el sistema inmune ya que se han descrito casos de inmunosupresión, leucopenia, eosinofilia con aumento de IgE, disminución del complemento, entre otros debido a la exposición a plaguicidas. Dichos efectos en el sistema inmunológico generan mayor índice de enfermedades y menor respuesta a agentes externos. La inmunotoxicidad se produce por mecanismos directos e indirectos (Aroonvilairat et al., 2015; Castillo-Cadena et al., 2013; Mitra, Sarkar, & Chatterjee, 2017).

El estrés oxidativo es un mecanismo directo que produce inmunotoxicidad, ya que el metabolismo de los plaguicidas genera especies de oxígeno reactivas, las cuales inducen lesiones o letalidad en los diversos componentes celulares como son los lípidos, proteínas e incluso el ADN. Inhibiendo la función de los linfocitos, el metabolismo de las inmunoglobulinas, la cooperación de los macrófagos o la síntesis de células de la fórmula blanca (inmunotoxicidad).

Otro mecanismo directo que produce efectos nocivos en el sistema inmunológico es la disfunción mitocondrial y la inducción de mediadores proinflamatorios por las células endoteliales, que son efectos mediatos propiciados por el contacto con plaguicidas.

Dentro de los mecanismos indirectos se encuentra la afección de otros sistemas tales como endocrinos y circulatorios que afectan los mecanismos inmunológicos. El más estudiado es la afectación del sistema endocrino, ya que el sistema inmune se encuentra controlado por hormonas. Al haber disrupción endocrina se pierde la homeostasis del sistema inmune produciendo fallas en la respuesta inmunológica (Bini Dhouib et al., 2016a; Corsini et al., 2013a).

Enfocarse en un solo tipo de plaguicidas en la investigación de campo es complicado, debido al uso de mezclas en la agricultura, por lo que los estudios realizados en los humanos se basan en la interacción con mezclas de agroquímicos (Dreyer et al., 2016; Martínez-Valenzuela & Gómez-Arroyo, 2007; Ortega Freyre et al., 2016), a diferencia de las investigaciones realizadas en animales donde se pueden controlar mejor estas variables. Resulta importante continuar realizando investigaciones para caracterizar completamente un efecto negativo, incluyendo componentes de exposición y cuantificar la exposición a lo largo plazo.

1.4. Biomarcadores

Los biomarcadores representan una herramienta importante en toxicología ya que permiten la estimación del efecto sobre el tejido diana, consideran la variabilidad inter e intra-individual y constituyen indicadores sensibles de eventos patológicos y de alteraciones subclínicas, por lo que pueden ser útiles en estrategias diagnósticas y preventivas (Magnarelli, 2015a)

Un biomarcador desde el punto de vista toxicológico, se define como una respuesta biológica a un agente químico, la medición de un xenobiótico en un sistema biológico es una medida de la exposición (Robert et al., 2007). Los biomarcadores se clasifican como:

- *Exposición* evalúan la carga corporal de un xenobiótico, un metabolito o el producto de la interacción entre el xenobiótico y un órgano blanco.
- *Efecto* indican cambios a nivel celular y cambios patológicos tempranos.
- *Susceptibilidad* indican una capacidad constitutiva de un individuo para responder a exposiciones específicas.

Uno de los efectos de los plaguicidas es la generación de estrés oxidativo, es decir el desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno y la capacidad del sistema antioxidante para secuestrar estas especies, el cual puede ser evaluado de forma indirecta a través de biomarcadores como son: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y lipoperoxidación (Lipox) (Corrales & Muñoz, 2012; Costa et al., 2015). El estrés oxidativo produce daño en los múltiples sistemas y componentes del organismo como lípidos, proteínas e incluso el ADN, debido a lo cual pueden presentarse enfermedades graves como cáncer, malformaciones genéticas y alteraciones en el sistema inmunológico entre otras (Mokarizadeh et al., 2015; Waliszewski et al., 2015).

La exposición a plaguicidas ocasiona alteraciones en las funciones normales de los distintos componentes inmunológicos, por lo que estos pueden ser utilizados como biomarcadores (Corsini et al., 2013a). Algunos biomarcadores de inmunotoxicidad son el conteo de linfocitos, monocitos, eosinófilos, inmunoglobulinas, anticuerpos, interleucinas y complemento, entre otros. Que pueden verse alterados en problemas de inmunodeficiencia, alergia, autoinmunidad (Bini Dhouib et al., 2016a).

CAPÍTULO 2

2. Antecedentes

2.1. Estrés oxidativo por plaguicidas

El estrés oxidativo es un proceso normal en los sistemas biológicos. Para evitar la toxicidad del estrés oxidativo, el cuerpo mantiene el equilibrio (homeostasis) entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las enzimas antioxidantes. Los plaguicidas provocan el fracaso de los procesos homeostáticos y la generación de metabolitos tóxicos excede la capacidad antioxidante de las defensas del cuerpo. Se llevo a cabo una investigación bibliográfica en 2012 por la universidad colegio mayor de Cundinamarca, Colombia llegando a la conclusión de que las especies reactivas de oxígeno pueden dañar los componentes de la célula, incluidos los lípidos, las proteínas y el ADN, lo que genera un agotamiento en todos los sistemas biológicos que pueden llegar a evolucionar en procesos degenerativos, enfermedades crónicas o síndromes (Corrales & Muñoz, 2012).

Las ROS, particularmente el radical aniónico superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^-), son iniciadores potentes de la peroxidación de lípidos, que está relacionada con la patogénesis de diversas enfermedades (Rahal et al., 2014). Las bases de ADN también son muy susceptibles a la oxidación de ROS, causando reticulación, ruptura de cadenas, alteración en la estructura de las bases, mutaciones y deleciones tanto en el ADN nuclear como en el mitocondrial. Estos efectos pueden tener diferentes manifestaciones clínicas: demencia, accidentes cerebrovasculares,

diabetes, entre otros (Pisoschi & Pop, 2015). Asimismo, estas modificaciones oxidativas conducen a cambios funcionales en varios tipos de proteínas, que pueden tener un impacto fisiológico sustancial.

El estrés oxidativo es inducido por la exposición a plaguicidas (*in vivo* & *in vitro*), ya sea por sobreproducción de ROS, disminución de las defensas antioxidantes no enzimáticas y/o por deterioro de la función de las enzimas antioxidantes. La reducción de las enzimas antioxidantes (glutación reductasa, glutación transferasa, superóxido dismutasa) y la capacidad total antioxidante, así como el aumento de lipoperoxidación y marcadores de inflamación como TNF se han asociado a exposición de plaguicidas. Estos hallazgos se reportaron en 65 trabajadores de la comunidad Al-Salheya Algadeeda-Sharkeya, Egipto en 2011, 55 se encontraban expuestos a insecticidas y 10 expuestos a fungicidas (Mecdad et al., 2011).

Los resultados obtenidos en Egipto son concordantes con un estudio realizado en Durango, México en 2016. Se realizó un estudio observacional en 45 trabajadores del Comité de Sanidad Vegetal de Durango A.C que por su ocupación laboral se encuentran expuestos a plaguicidas. Además de encontrarse aumento en la lipoperoxidación, disminución de las enzimas antioxidantes y la capacidad total antioxidante, se determinó que existe 3.21 veces el riesgo de desarrollar aumento del estrés oxidativo en el grupo expuesto con respecto al grupo no expuesto. El consecuente aumento del estrés oxidativo genera depleción de energía mitocondrial ATP, inducción de enzimas proteolíticas, lipolíticas y fragmentación de ADN conduciendo a apoptosis celular provocando genotoxicidad, inmunotoxicidad, carcinogénesis entre otras (Kaur et al., 2015; Mecdad et al., 2011; Ortega Freyre et al., 2016).

La inducción de enzimas proteolíticas y lipolíticas en personas ocupacionalmente expuestas a plaguicidas se comprobó en un estudio observacional realizado en Italia (2015) en 55 agricultores. Se encontró un aumento de radicales libres, aumentando los productos finales de glicación avanzada (lipolisis) y los productos avanzados de proteínas de oxidación (proteólisis). En concordancia Lerro encontró en el 2018 un aumento de la lipoperoxidación en 30 agricultores de Iowa, EUA. El aumento resultante de ROS causa daño a las macromoléculas biológicas, y promueve la formación de nuevos compuestos. Lo que conlleva al desarrollo de numerosas enfermedades crónicas como son enfermedades autoinmunes, neurotoxicidad y cáncer, entre otras (Costa et al., 2015; Lerro et al., 2017).

La adecuada función de las enzimas antioxidantes ayuda al organismo a permanecer en homeostasis evitando el aumento de ROS y por lo tanto el desarrollo de enfermedades crónicas. Sin embargo, este equilibrio se ve afectado con la exposición crónica a plaguicidas. En 2018 se llevó a cabo una investigación en Santa Catarina, Brasil en 50 trabajadores rurales, en quienes se determinó un aumento significativo de la lipoperoxidación y la enzima catalasa en comparación con el grupo control. Concluyendo que los participantes expuestos están sujetos a un mayor riesgo de daño por estrés oxidativo y como consecuencia son más susceptibles a enfermedades derivadas de dichos daños (Hilgert Jacobsen-Pereira et al., 2018).

Otra enzima que juega un papel importante en la defensa antioxidante en la mayoría de las células de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Estudios han mostrado la relación que existe entre la exposición a plaguicidas y la disminución de enzimas antioxidantes, incluyendo SOD, en 2011 en India se comprobó que la exposición a mezclas de plaguicidas (clorpirifos, metilparatión y malatión) indujo dichos efectos en tejidos de rata siendo el principal contribuyente de la toxicidad total (Ojha, Yaduvanshi, & Srivastava, 2011). Se presentó el mismo decremento de la SOD en humanos en un estudio observacional en 50 agricultores de Argelia, África (2016) quienes además en concordancia con los estudios previamente comentados presentaron aumento de la liperoxidación y disminución de glutatión reductasa, glutatión S-transferasa y catalasa con respecto al grupo control; concluyendo que el estrés oxidativo y la disminución de la respuesta antioxidante es un reflejo de la exposición a plaguicidas (Madani et al., 2016). Dos años después se observó en 84 agricultores brasileños la reducción significativa de las enzimas antioxidantes (SOD, GR y GST) y el aumento de la lipoperoxidación, lo que compromete la salud de la población expuesta ocupacionalmente a plaguicidas (Cattelan et al., 2018).

2.2. Inmunotoxicidad por plaguicidas

La producción de estrés oxidativo produce efectos adversos en la función inmune lo que puede conducir a la mayor incidencia o gravedad de enfermedades infecciosas, debido a la disminución o supresión de la respuesta del sistema inmunológico (Bar-Or et al., 2015). Se ha determinado que la activación, expansión o supresión de células T reguladoras por xenobióticos, representa un mecanismo relevante subyacente a la inmunotoxicidad (Emanuela Corsini et al., 2011).

Se ha reportado asociación de la exposición a plaguicidas con reacciones de hipersensibilidad y enfermedades del tracto respiratorio como asma, rinitis, entre otras. (Mamane et al., 2015). Existe

una creciente incidencia en las enfermedades autoinmunes asociadas a exposición de plaguicidas como son lupus eritematoso y artritis reumatoide (Mostafalou & Abdollahi, 2013). Se ha avanzado en el reconocimiento de alteraciones epigenéticas del cáncer (Costa et al., 2015).

En 2011 en un estudio en el Cairo, Egipto, se determinó Lipoperoxidación, capacidad total antioxidante, IgM y G, Factor de Necrosis Tumoral α y anamnesis clínico-laboral con énfasis en el sistema inmunológico a 65 personas ocupacionalmente expuestas (POE) a mezclas de plaguicidas. Se concluyó que la exposición crónica a plaguicidas conduce a un aumento del estrés oxidativo, disminuye la capacidad antioxidante y modulación del sistema inmune que implica deterioro de funciones inmunes humorales y celulares (Mecdad et al., 2011).

En Japón, en el año 2012 se realizó un experimento centrándose en la modulación del potencial alérgico *in vitro* en ratones por plaguicidas OF, demostrando que las alergias tipo 1 (atópica o anafiláctica) se ven agravadas por la exposición previa a plaguicidas. (Fukuyama et al., 2012). En recientes investigaciones se ha demostrado que esto también se observa en la POE a mezclas de plaguicidas, Hoppin y colaboradores, realizaron un estudio de casos y controles en Carolina de Norte en 5,814 mujeres agricultoras, concluyendo que los plaguicidas contribuyen al asma atópico, pero no al asma no atópico (Hoppin et al., 2008).

Existe un aumento en el título de autoanticuerpos, disminución de IgG e IgM concluyendo en una asociación en la exposición a plaguicidas y alteraciones en inmunoglobulinas (E. Corsini et al., 2013a; Mecdad et al., 2011). Se correlacionó el aumento de las inmunoglobulinas E y eosinofilia con la exposición crónica a plaguicidas en 64 floricultores de Tailandia, aumentando la sensibilidad a alérgenos (Aroonvilairat et al., 2015). En contraste con los resultados de Castillo-Cadena *et al.* y Ündeğer y Başaran quienes no obtuvieron variaciones en las inmunoglobulinas. Ündeğer y Başaran realizaron su estudio observacional en Ankara, Turquía en 33 agricultores expuestos a plaguicidas, únicamente investigaron efectos en las inmunoglobulinas donde no encontraron cambios significativos (Castillo-Cadena et al., 2013; Ündeğer & Başaran, 2001).

Con respecto a la fórmula blanca que forma parte del sistema inmunológico, se ha observado una disminución de la respuesta inmunológica que se refleja en la disminución de los leucocitos totales, plaquetas, subtipos de linfocitos o la disminución de algunos granulocitos. Un ejemplo de ello es el estudio realizado en Villa del Guerrero, México por Castillo-Cadena *et al.* quienes

no encontraron alteraciones en la fórmula blanca de los 38 sujetos de estudio expuestos a plaguicidas, disminución de linfocitos T e índice mitótico de cultivos de linfocitos (Castillo-Cadena et al., 2013).

En 2018 se realizó un estudio en 152 agricultores brasileños, 84 expuestos a plaguicidas en los cuales además de observarse estrés oxidativo, se observó una disminución significativa del total de los leucocitos, plaquetas y monocitos, sin presencia de daño mutagénico, indicando efectos adversos en la población por lo que se sugirió la evaluación y biomonitoreo a largo plazo (Cattelan et al., 2018). Los linfocitos B son otro tipo de leucocitos que se han visto afectados por la exposición a plaguicidas, los cuales se vieron disminuidos en 64 agricultores tailandeses expuestos crónicamente a plaguicidas, a pesar de ser cambios sutiles, deben ser utilizados con precaución por parte de estos agricultores para evitar efectos nocivos a largo plazo (Aroonvilairat et al., 2015).

A continuación, se señalan los efectos inmunotóxicos reportados para algunos grupos de plaguicidas:

2.2.1. Carbamatos (CB)

La exposición a carbamatos (CB), provoca la inhibición de las serinas hidrolasas en las células inmunes, el daño oxidativo a los órganos inmunes y la modulación de las vías de transducción de señales. Interfieren con las vías de transducción de señales, el metabolismo, las estructuras celulares y tisulares entre otras. Los principales mecanismos de acción de la inmunotoxicidad del carbamato son: (1) Inhibición de la esterasa, principalmente por inhibición de la AChE que conduce a cambios estructurales y funcionales en las poblaciones de inmunocitos. (2) Estrés oxidativo, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que inhiben el citocromo c oxidasa y que atacan las cadenas laterales de fosfolípidos de los ácidos grasos insaturados, lo que causa una reducción de la fluidez de la membrana de las células inmunitarias. (3) La alteración endocrina altera la homeostasis y la función del sistema inmunitario mediante modificaciones en la señalización del receptor de GnRH en las células inmunitarias o indirectamente mediante la alteración en la secreción de cortisol de la glándula suprarrenal (Bini Dhouib et al., 2016a; Dhouib et al., 2016).

Los trabajadores expuestos a CB presentan diferentes efectos negativos en el sistema inmunológico, como la inhibición de la capacidad de destrucción de los neutrófilos, cambios en

el recuento de células T (aumento de CD8 y disminución de CD4), producción de anticuerpos, alta concentración de IgE, entre otros. Los CB pueden producir supresión inmunológica, lo que aumenta el riesgo de respuestas alérgicas contra los alérgenos (Aroonvilairat et al., 2015; Mecdad et al., 2011).

2.2.2. Organofosforados (OF)

Se ha informado daño directo en el sistema inmunológico en animales (*in vivo* e *in vitro*) y en humanos expuestos a organofosforados (Canbaz et al., 2017; Gangemi et al., 2016). La exposición a OF conduce al incremento de autoanticuerpos, la disminución de la proliferación de células T y la inhibición de la actividad citotóxica habitual de las células NK y los linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés), lo que lleva a un incremento de las enfermedades e infecciones autoinmunes (Hossain & Sikder, 2015).

Los principales mecanismos de inhibición de las diferentes células de linfocitos T (NK, CTL y LAK) son: (1) la alteración en las vías de exocitosis de gránulos al disminuir los niveles intracelulares de perforina, granzima y granuysina. (2) perjudicar la vía FasL / Fas. (3) Inducción de la apoptosis de las células inmunitarias (Emanuela Corsini et al., 2011). Las OP también afectan el sistema inmunológico a través de la inhibición de las serinas hidrolasas y esterases en diferentes células inmunitarias, además de generar daño oxidativo entre otras vías.

Debido a los efectos negativos de los OF en los sistemas biológicos, existe una relación bien conocida entre el incremento de la infección y la sobreexposición a los OF, varios estudios en agricultores expuestos ocupacionalmente muestran efectos negativos como alteraciones de las funciones de los neutrófilos, es decir, fagocitosis, estallido respiratorio, adhesión acompañados de aumento de infecciones del tracto respiratorio superior (amigdalitis, faringitis y bronquitis). La combinación de dos o más plaguicidas diferentes (organofosforados y carbamatos) produce complicaciones respiratorias tales como neumonía debido a la inmunosupresión (Fernández, Mancipe, & Fernández, 2010; Mitra et al., 2017).

2.2.3. Organoclorados (OC)

Los OC reducen el transporte de K^+ y promueven la entrada y activación de Na^+ dentro de la célula, lo que abre los canales de la membrana axonal produciendo una excitabilidad del sistema nervioso central (SNC) hiper anormal. Además, los OC promueven los genes de mutación

(inmunorreguladores) debido a la modificación en la activación de las vías inmunológicas (Kumar et al., 2014).

La exposición de los POE a los OC induce un incremento en la IgG y una disminución en la IgM sérica y el complemento C3 (Kumar et al., 2014). Además, los OC llevan a un decremento en el recuento de glóbulos blancos, la migración de macrófagos, la respuesta humoral y celular. Esos factores en adultos y niños se correlacionan con las patologías alérgicas respiratorias es decir, rinitis, sinusitis, afecciones por infertilidad, calidad del semen, conteo de espermatozoides y defectos morfológicos y carcinogénesis por daño en el ADN (Jayaraj et al., 2016).

En las etapas prenatales, la exposición a los OC está asociada con una disminución leve en los recuentos de neutrófilos y un aumento en los recuentos de basófilos. Este resultado sugiere efectos negativos en el desarrollo del sistema inmunológico y, por lo tanto, las infecciones infantiles comunes aumentan el riesgo de mortalidad (Oulhote et al., 2017). En mujeres embarazadas expuestas a OC, existe un incremento en los linfocitos *natural killer*. La exposición en la vida embrionaria se ha correlacionado con la predisposición a sangrado, leucopenia y alteración en los niveles de citoquinas de TNF- α e IL-10 (Corsini et al., 2013b; Lee et al., 2016).

2.2.4. *Piretroides (Py)*

Existe controversia en la comunidad científica debido a experimentos realizados en ratones, ratas o perros que sugieren que no hubo pruebas consistentes de inmunotoxicidad por piretroides (Burns & Pastoor, 2018). El conocimiento sobre el mecanismo específico de la acción de Py es escaso, sin embargo, han demostrado que la exposición causa apoptosis y cambio en el perfil de secreción de monocitos (Y. Zhang et al., 2010).

A pesar de la inocuidad del Py en humanos, se han reportado efectos neurológicos como entumecimiento de lengua y labios, letargo, temblores musculares o convulsiones. Además, se han informado efectos inmunológicos como inmunosupresión, disminución de linfocitos y asesinos naturales (Costa et al., 2013; Gangemi et al., 2016). En trabajadores expuestos a Py, se ha informado un nivel más alto de IgE sérica, que está asociada con enfermedades respiratorias atópicas como el asma y la rinitis (Javed et al., 2015; Mamane et al., 2015).

Asimismo, la exposición a mezclas de plaguicidas que incluyen Py produce inmunotoxicidad demostrada con la reducción en el número y función de los linfocitos B. Los efectos negativos sobre los linfocitos B perturban la respuesta inmune humoral (Aroonvilairat et al., 2015).

2.3. Planteamiento del problema

2.3.1. *Uso de plaguicidas en la agricultura en la zona protegida de la fauna y flora del nevado de Toluca, zona: Calimaya, Estado de México*

En la República Mexicana se utiliza 60 % de los 22 plaguicidas clasificados como perjudiciales para la salud y el ambiente, el 42 % de los cuales se fabrican en el país. Se emplean 30 plaguicidas de 90 que han sido cancelados o restringidos en EUA. Los cultivos más vulnerables son: maíz, algodón, papa, chile, jitomate, frijol, trigo, aguacate, café y tabaco. Según la FAO se usan en promedio 4.55 toneladas de plaguicidas por cada 1000 hectáreas en un periodo de un año (FAO, 2016; García & Rodríguez, 2012).

En México, los plaguicidas de mayor uso son los herbicidas, seguidos de insecticidas y fungicidas. Entre los herbicidas destacan paraquat y glifosato. Los insecticidas más usados son los organofosforados como el paratión metílico, metamidofos y malatión y entre los fungicidas tenemos al mancozeb y clorotalonil. En el Estado de México se han desarrollado investigaciones sobre inmunotoxicidad por generación de estrés oxidativo por el uso de plaguicidas tanto en modelos animales como en seres humanos (Castillo-Cadena et al., 2013; Tecuapetla, Amaya, & Sánchez, 2014). Destacando el municipio de Calimaya con 467 registros de unidades de producción de maíz, 38 de papa y 18 de avena forrajera (Gobierno de Calimaya/IGECM, 2016). En el 2016, Delgado y colaboradores identificaron 64 productos químicos que se emplean en las áreas de cultivo, de los cuales 14 presentan características de persistencia (benalaxyl M, bifentrina, cipermetrina, cisflutrin, clorotalonil, clorpirifos, diazin, endosulfán, fipronil, fluopicolide, flutolanil, fenfuflen, permotrina y quintozeno), con una alta frecuencia de uso (cada 4-6 días durante el año) y emisión al ambiente (11560.32 a 856.32 kg/ha/año).

Los plaguicidas: cipermetrina, clorotalonilo, clorpirifos, endosulfán y quintozeno resaltan por ser moderadamente tóxicos y persistentes en el ambiente aumentando el riesgo de inmunotoxicidad por exposición crónica de la población ocupacional expuesta (POE) (Delgado, Amaya, & Sánchez, 2016; U.S. Department of Health and Human Services, 2017). La detección precoz del

daño oxidativo permite tomar medidas higiénico-dietético y de seguridad necesarias para la POE, disminuyendo con ello el riesgo de desarrollar efectos inmunológicos y enfermedades crónicas.

2.4. Justificación

El municipio de Calimaya, Estado de México cuenta con un territorio de 520.5 kilómetros cuadrados siendo el mayor territorio ocupado por el sector primario con 73.72% dedicado a la Agricultura (Gobierno de Calimaya/IGCEM, 2016), requiriendo para la adecuada producción agrícola el uso de plaguicidas. Se puede realizar una estimación con lo mencionado por la FAO en 2016: en México se usan en promedio 4.55 toneladas de plaguicidas por cada 1000 hectáreas en un periodo de un año (FAO, 2016). En el mismo año en Calimaya se detectó la presencia de 14 plaguicidas con características de persistencia empleados en las áreas agrícolas.

Los plaguicidas son compuestos químicos que han facilitado el control de plagas y actualmente continúan siendo recursos de primera elección en diversas áreas de salud pública (seguridad alimentaria y antropozoonosis, entre otros) incluyendo su uso en la agricultura, sin embargo, no son inocuos para los componentes de los ecosistemas incluyendo los seres humanos.

Estos compuestos químicos son utilizados en los cultivos de Calimaya con poca regulación, monitoreo y sin el equipo necesario para protegerse de su toxicidad (Delgado et al., 2016). Lo que vulnera principalmente a la POE, aumentando el riesgo de exposición y con ello los posibles efectos negativos. La temprana identificación del estrés oxidativo e inmunotoxicidad a través de biomarcadores permite establecer medidas preventivas y de mitigación para disminuir los riesgos de efectos nocivos a la salud de los agricultores.

A pesar de los múltiples estudios sobre inmunotoxicidad por plaguicidas en humanos se necesitan más estudios de exposición crónica, disminuyendo los sesgos por multifactoriedad (edad, género, nivel socioeconómico, actividad de riesgo, entre otros). La información sobre la inmunotoxicidad por exposición a mezclas de plaguicidas es limitada y controvertida, por lo que es necesario continuar las investigaciones. Principalmente son necesarios estudios de efectos crónicos para complementar los estudios realizados hasta el momento. Por lo que resulta importante determinar la inmunotoxicidad y estrés oxidativo de los agricultores de Calimaya.

2.5. Hipótesis

La población ocupacionalmente expuesta en forma crónica a plaguicidas utilizados para la agricultura en Calimaya Estado de México, presentan inmunotoxicidad correlacionada con los niveles de estrés oxidativo de las células sanguíneas.

2.6. Objetivos

2.6.1. *Objetivo general*

Evaluar la inmunotoxicidad en agricultores, expuestos crónicamente a mezclas de plaguicidas en el Municipio de Calimaya, Estado de México y su correlación con el estrés oxidativo en células sanguíneas, para identificar efectos a la salud por exposición crónica a plaguicidas.

2.6.2. *Objetivos específicos*

- Definir y caracterizar a las poblaciones de estudio (grupo ocupacionalmente expuesto y grupo testigo) a través del instrumento de investigación.
- Realizar anamnesis clínico-laboral y exploración física a cada individuo de estudio para determinar el estado general de salud de cada individuo participante y los factores de riesgo asociados a la exposición a plaguicidas.
- Cuantificar la fórmula blanca e inmunoglobulinas como marcadores de inmunotoxicidad, en los grupos de estudio.
- Determinar el estrés oxidativo en células sanguíneas a través de la actividad de las enzimas CAT, SOD y Lipoperoxidación en cada uno de los grupos de estudio para conocer indirectamente el estado del sistema antioxidante de cada participante.
- Establecer el grado de asociación entre los biomarcadores de inmunotoxicidad y estrés oxidativo tomando en cuenta los datos de exposición obtenidos del cuestionario de usos y costumbres de la población de estudio (multifactoriedad).

CAPÍTULO 3

3. Metodología

3.1. Metodología

3.1.1. *Diseño de estudio*

El presente trabajo es un estudio transversal comparativo.

3.1.2. *Universo de trabajo*

A los grupos de estudio se les realizó una invitación a participar a través de la Secretaría de Desarrollo Económico, Fomento Agropecuario y Turístico del H. Ayuntamiento de Calimaya. El grupo de estudio expuesto está conformado por los agricultores del municipio de Calimaya, Estado de México, quienes emplean cotidianamente plaguicidas, por lo que están crónicamente expuestos (exposición mayor o igual a 12 meses). El grupo testigo son aquellos habitantes del municipio de Calimaya que no se encuentren expuestos por ocupación laboral a plaguicidas, se aplicaron los mismos criterios de inclusión, exclusión y eliminación que el grupo expuesto.

3.1.2.1. *Gestión*

Para la realización de la presente investigación se solicitó apoyo y permiso al presidente Municipal de Calimaya, Estado de México (Anexo C), asimismo se contó con el apoyo de los

directivos de los centros de salud de la comunidad de Santa María Nativitas, exponiendo el propósito y la naturaleza del estudio, así como los beneficios.

3.1.2.2. Ética del estudio

Se respetaron los criterios éticos para investigaciones en salud, los cuales son: proteger la vida, la salud, la intimidad y la dignidad del ser humano; asimismo se buscó cumplir con la ética de los protocolos de investigación epidemiológica: privacidad, confianza, confidencialidad y anonimato. Cada participante que decidió voluntariamente participar en la presente investigación, firmó su carta de consentimiento informado individual. para evitar problemas éticos, sociales y legales (Diario Oficial de la Federación, 2005) ya que se preguntaron datos privados personalmente identificables y se les tomó muestra sanguínea. Cabe resaltar que se dejó claro el propósito, la naturaleza y los beneficios de la participación en el estudio (Anexo A). Los voluntarios tuvieron la posibilidad de abandonar el estudio si así lo deseaban.

El principal beneficio de la participación de la población en este estudio fue tener una mejor idea sobre su estado de salud en general. por la exposición crónica a plaguicidas. Se informó a cada uno de los participantes los resultados individuales de los biomarcadores, además a los participantes que requirieron de atención médica por alguna condición clínica se les dio una consulta médica impartida por la Dra. Helen's Irais Sánchez Mendoza y se recomendó acudir con su médico familiar para su seguimiento.

3.1.3. Método de muestreo y tamaño de muestra

El método de muestreo fue por conveniencia. Existen 2148 habitantes dedicados al sector primario en Calimaya, Estado de México de los cuales 867 son agricultores (Gobierno de Calimaya/IGECM, 2016). A partir del conocimiento del tamaño del universo de trabajo se determinó el tamaño de muestra por analizar (65 personas por cada grupo de estudio) con un nivel de confianza de 95% y desviación estándar de 3%, utilizando la ecuación descrita a continuación, la cual es empleada para la determinación de muestra en poblaciones finitas (Aguilar-Barojas, 2005).

Ecuación 1

$$n = \frac{(N)(Z^2)(\sigma^2)}{[(N - 1)(E^2)] + [(Z^2)(\sigma^2)]}$$

Dónde

N Total de la Población

Z Nivel de Confianza

E Error muestral

σ Desviación estándar

3.1.4. Operacionalización de las variables

Tabla 4 Operacionalización de las variables

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis estadísticos	
Exposición crónica a plaguicidas	Contacto directo o indirecto por 12 meses o más a plaguicidas	Exposición por 12 meses o más a plaguicidas	Cualitativa	Presente o ausente	Chi cuadrada	
Plaguicidas	Sustancias destinadas a la eliminación, control y prevención de plagas.	Tipo de plaguicidas que utilizan	Cualitativa	Organoclorados Organofosforados Carbamatos Piretroides	Chi cuadrada	
Tiempo de exposición	Duración de contacto con plaguicidas	Tiempo laboral en el que se encuentran expuestos a plaguicidas	Cuantitativa	Horas, días, meses, años	Medidas: tendencia central y dispersión, t de Student	
Peso	Medida de fuerza con la que la tierra atrae a un cuerpo	Numero de kilogramos de peso de cada individuo	Cuantitativa	kg	Medidas: tendencia central y dispersión	
Talla	Altura de una persona	Altura de cada individuo	Cuantitativa	m		
Edad	Tiempo que ha vivido una persona contando desde su nacimiento	Número de años cumplidos a partir de su fecha de nacimiento	Cuantitativa	Años	Medidas: tendencia central y dispersión OR	
Sexo	Condición orgánica que distingue a un hombre de una mujer	Caracteres sexuales	Cualitativo	Hombre/Mujer	Chi cuadrada	
IMC	Medida que asocia el peso y la talla de un individuo	Cálculo del índice de masa corporal con base en la talla y peso	Cualitativa	Obesidad Sobrepeso Normopeso Desnutrición	Chi cuadrada	
Biomarcadores	Estrés oxidativo	Respuesta biológica a un agente químico, la medición de un xenobiótico o su acción en un sistema biológico.	Capacidad del sistema antioxidante para secuestrar ROS	Cuantitativa	Concentración de cada biomarcador en sangre	Medidas: tendencia central y dispersión. t de Student
			Efectos adversos sobre el funcionamiento del sistema inmunológico	Cualitativa	o suero sanguíneo	
	Inmunotoxicidad			Presente, ausente		Correlación de Spearman y R. Lineal

3.1.5. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

3.1.5.1. Criterios de Inclusión

- Población ocupacionalmente expuesta a plaguicidas de Calimaya, Estado de México con una exposición de 12 meses o más, que tuvieran entre 18 y 50 años.
- Contar con firma de carta de consentimiento informado.
- Personas sin diagnóstico de enfermedad crónico-degenerativa.
- Personas sin tratamiento médico crónico, ni toma de medicamentos por lo menos 15 días previos a la toma de muestra sanguínea.

3.1.5.2. Criterios de exclusión

- Personas con enfermedades crónico-degenerativas como: diabetes mellitus, cáncer, hipertensión arterial sistémica, EPOC, anemia dislipidemias y artritis reumatoide entre otras.
- Personas con capacidades diferentes
- Mujeres embarazadas

3.1.5.3. Criterios de Eliminación

- Personas que no aceptaron la toma de muestra sanguínea
- Personas que presentaron muestra hemolizada o contaminada.
- Personas de las cuales la muestra fue insuficiente para la determinación de biomarcadores.
- Personas con adicciones a drogas de abuso o drogas legales, con índice de tabaco ≥ 10 e índice de consumo de alcohol ≥ 100 . Dichos índices fueron establecidos por la OMS donde no sean reportado efectos crónicos adversos a la salud de los seres humanos (World Health Organization (WHO), 2011, 2018).

3.1.6. Procedimiento

En la

Figura 2 se muestra el proceso metodológico que se siguió para la realización de la presente investigación. A continuación, se describen cada uno de los apartados.

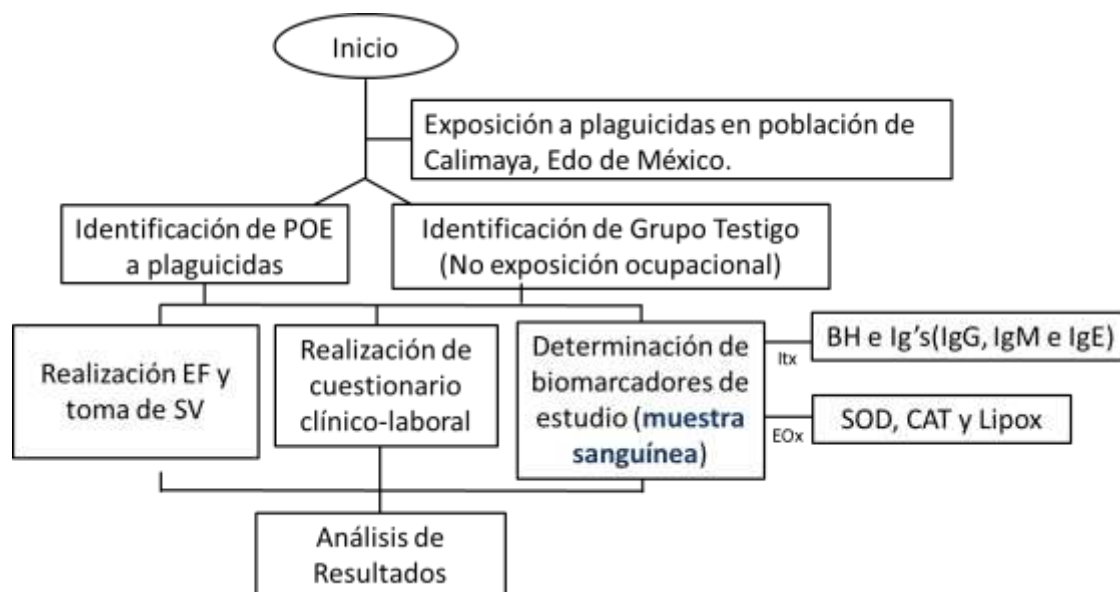


Figura 2 Diagrama de flujo de la metodología de investigación realizada en este proyecto.

3.1.6.1. Toma de muestra, transporte y preparación

Las personas que cumplieron con los criterios de inclusión y decidieron participar voluntariamente en el proyecto de investigación, se les dio a conocer el objetivo y la confidencialidad de la investigación, firmaron el consentimiento informado.

Toma de muestra. Se les citó en la delegación de las comunidades Santa María Nativitas y Zaragoza de Guadalupe pertenecientes al H. Ayuntamiento de Calimaya, para realizar su historia clínica-laboral, exploración física y toma de muestra sanguínea, que consistió en:

- Exploración física, dirigida a detectar condiciones generales de salud. Así como aplicación de cuestionario estructurado (ver anexo B).
- Se obtuvieron 11 ml de sangre por venopunción: un tubo de 3mL con heparina para determinación de EOx, un tubo con 3 mL con EDTA para la medición de parámetros de

la biometría hemática, y uno con 5 ml con gel separador para la cuantificación de inmunoglobulinas

Transporte y preparación de las muestras. Las muestras se trasladaron en una nevera portátil sumergidas en baño de hielo hasta el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, de la UAEMéx donde se procedió a la obtención de plasma. Entre la extracción y el procesado no transcurrió un tiempo superior a 6 horas.

Conservación de las muestras. La muestra del tubo con gel separador centrifugó a 3000 rpm/10 minutos, obteniendo el plasma, el cual se dividió en alícuotas de 1 mL, para su posterior conservación a temperatura inferior a -20°C , hasta el momento de su análisis (máximo 3 meses). El tubo con heparina se procesó de acuerdo a los pasos descritos en la sección de determinación de EOx.

3.1.6.2. *Determinación de biometría hemática*

Biometría Hemática: Se analizó con un analizador hematológico automatizado para uso de diagnóstico en el laboratorio clínico. El equipo es un citómetro de flujo que utiliza la tecnología VCS (Volumen, Conductividad y Dispersión) que permite la clasificación de las células según el tamaño volumétrico y características físicas de las mismas con una fuente de luz láser realizadas en forma simultánea (AGC, 2012).

3.1.6.3. *Determinación de biomarcadores de inmunotoxicidad*

Determinación de Ig E, G y M: La cuantificación de las inmunoglobulinas se realizó mediante turbidimetría. En este método las muestras de suero sanguíneo (contienen Ig's) a temperatura ambiente, se les añade un diluyente y a continuación se añaden anticuerpos anti-inmunoglobulinas (específico), resultando la formación de un complejo antígeno-anticuerpo que produce turbidez que se mide por espectrofotometría. La concentración de inmunoglobulinas se determinó a través de una curva estándar.

Determinación de Ig E

Se determino la concentración de Inmunoglobulina E a partir de la metodología establecida por el fabricante (Spinreact, 2011a) la cual se describe mediante un diagrama de flujo (ver

Figura 3). Se calentó a 37 ° C el diluyente (tapón glicina, pH de 8.3, azida sódica 0.95 g/L), el reactivo (partículas de látex cubiertas con IgG de ratón anti-IgE humana, pH de 7.3, azida sódica 0.95 g/L) y las celdas termoeestables. Se ajustó el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada. Se mezcló 15µL de suero sanguíneo fresco de ≤ 7 días a 2-8 ° C o ≤ 3 meses a -20 ° C, 650 µL del diluyente y 350 µL del reactivo, se midió la absorbancia a una $\lambda = 570$ nm inmediatamente y a los 5 minutos de realizada la mezcla. La concentración de la inmunoglobulina se determinó por interpolación de la diferencia de las absorbancias ($A_2 - A_1$) en la curva de calibración previamente realizada (ecuación de la recta $y = 6 \times 10^{-5} - 0.0008$ y coeficiente de regresión 0.99) las unidades se expresan en U/mL. El valor de referencia es ≤ 300 UI/ml).

Determinación de Ig G

Se determino la concentración de inmunoglobulina G a partir de la metodología establecida por el fabricante (Spinreact, 2011b) dicho procedimiento se describe mediante un diagrama de flujo (ver

Figura 3). Se calentaron a 37 ° C el diluyente (tapón tris 20mmol/L, PEG 8000, pH de 8.3, azida sódica 0.95 g/L), el reactivo (suero de cabra anti-IgG humana, pH de 7.5, azida sódica 0.95 g/L) y las celdas termoeestables. Se ajustó el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada. Se mezclaron 10 µL de suero sanguíneo fresco de ≤ 7 días a 2-8 ° C o ≤ 3 meses a -20 ° C y 800 µL del diluyente inmediatamente se leyó la absorbancia a una $\lambda = 600$ nm, posteriormente se agregaron 200 µL del reactivo y se midió la absorbancia a una $\lambda = 600$ nm después de 2 minutos de añadir el reactivo. La concentración de la inmunoglobulina se determinó por interpolación de la diferencia de las absorbancias ($A_2 - A_1$) en la curva de calibración previamente realizada (ecuación de la recta $y = 0.0002x + 0.0685$ y coeficiente de regresión 0.99) las unidades se expresan en mg/dl. El valor de referencia es 639-1600 mg/dl).

Determinación de Ig M

Se determino la concentración de inmunoglobulina M a partir de la metodología establecida por el fabricante (Spinreact, 2011c) en la

Figura 3 se describe el presente procedimiento mediante un diagrama de flujo. Se calentaron a 37 ° C el diluyente (tapón tris 20 mmol/L, PEG 8000, pH de 8.3, azida sódica 0.95 g/L), el reactivo (suero de cabra anti-IgM humana, pH de 7.5, azida sódica 0.95g/L) y las celdas

termoestables. Se ajustó el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada. Se mezclaron 10 μ L de suero sanguíneo fresco de ≤ 7 días a 2-8 ° C o ≤ 3 meses a -20 ° C y 800 μ L del diluyente inmediatamente se leyó la absorbancia a una $\lambda = 340$ nm, posteriormente se agregaron 200 μ L del reactivo y después de 2 minutos se leyó nuevamente la absorbancia a una λ de 340 nm. La concentración de la inmunoglobulina se determinó por interpolación de la diferencia de las absorbancias ($A_2 - A_1$) en la curva de calibración previamente realizada (ecuación de la recta $y = 0.0011x - 0.011$ y coeficiente de regresión 0.99) las unidades se expresan en mg/dl. El valor de referencia es 40-230 mg/dl).

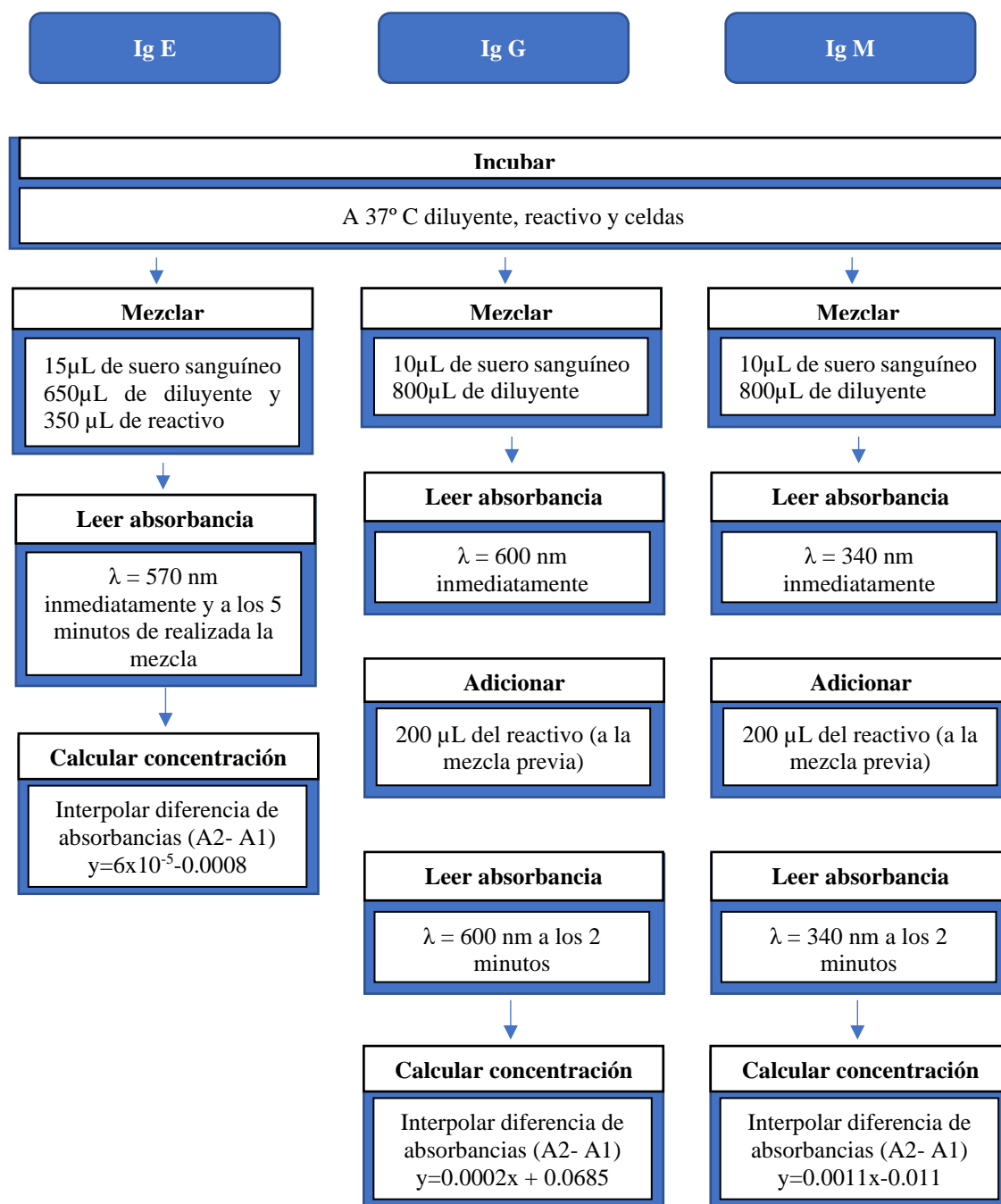


Figura 3 Diagrama de flujo de la determinación de la concentración de inmunoglobulinas.

3.1.6.4. Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo.

Todas las lecturas de los ensayos enzimáticos se realizaron en un espectrofotómetro UV-visible.

Superóxido dismutasa (SOD): La determinación se realizó según el método descrito por Misra and Fridovich (1972), la cual cuantifica en eritrocitos lisados libres de hemoglobina y otras proteínas, la inhibición de la autooxidación de la adrenalina a adrenocromo (color marrón) en

medio básico. La SOD reacciona con el ion de oxígeno O_2^- (Figura 4) que se forma durante la oxidación de la epinefrina y se ralentiza como resultado de la formación de adrenocromo inhibiendo la oxidación de la epinefrina.

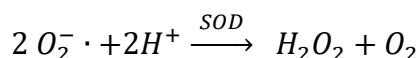


Figura 4 Esquematzación de la reacción enzimática de la actividad de la Superóxido Dismutasa

Para la cuantificación se colocan 150 μ L de homogenizado de eritrocitos y 750 μ L de solución reguladora de carbonatos (bicarbonato de sodio 50 mM, carbonato de sodio 50 mM, EDTA 0.1 mM ajustada a un pH de 10.2 con carbonato de sodio en polvo) en una celda y se adicionaron 600 μ L de adrenalina. Se mide la actividad en $U\ g^{-1}\ Hb$ mediante la diferencia de la absorbancia a los 0 s, 30 s y 5 min a una $\lambda = 480nm$.

Catalasa (CAT): La determinación se hizo según el método descrito por Radi *et al.*, (1991) basado en la siguiente reacción:

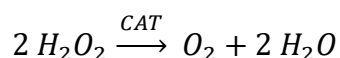


Figura 5 Esquematzación de la reacción enzimática de la actividad de la Catalasa

La descomposición del H_2O_2 , se mide por el descenso de absorbancia a una λ de 240nm, la técnica se fundamenta en la descomposición del peróxido de hidrógeno mediante el cambio de absorbancia por minuto. Las actividades se expresan como $U\ g^{-1}Hb$. Se colocan 20 μ L del homogenizado de eritrocitos y un mililitro de solución reguladora de aislamiento a un pH de 7.4 en una celda de cuarzo y se adicionarán 200 μ L de peróxidos. Se mide la actividad en $U\ g^{-1}\ Hb$ a través de la disminución de la absorbancia a los 0 y 30s a una λ de 240nm.

Lipoperoxidación (Lipox): Se determinó siguiendo la técnica de Buege and Steven, (1978), en la cual se toman 500 μ L de sangre que reaccionan con ácido tricloroacético y ácido tiobarbitúrico a una temperatura de 92 °C por 45 minutos y después de enfriarlo en baño de hielo se mide la absorbancia a una λ de 535 nm. Las unidades se expresan en mmol MAD/g Hb.

3.1.7. Análisis estadístico de resultados

Todos los resultados se introdujeron en una base de datos generada en el software SPSS versión 16 y se procesaron estadísticamente de la siguiente forma:

- Se estableció el perfil de los individuos mediante una distribución de frecuencias y se calculó las medidas de tendencia central y dispersión.
- Se utilizaron pruebas paramétricas para determinar la bondad de ajuste a una distribución normal y se analizó la homogeneidad de las varianzas de cada una de las muestras comparadas.
- Las variables continuas biológicas con homogeneidad y distribución normal se analizaron mediante t de Student entre grupos de estudio.
- Las variables continuas biológicas que no cumplieron con homogeneidad y distribución normal se analizaron mediante U de Mann-Whitney entre grupos de estudio.
- Por medio de las variables cualitativas se determinará la probabilidad de que la exposición a plaguicidas aumente el riesgo de inmunotoxicidad, esto a través de la determinación de un análisis bivariado como multivariado.

CAPÍTULO 4

4. Resultados

4.1. Resultados

En este estudio participaron del municipio de Calimaya un total de 73 individuos ocupacionalmente expuestos crónicamente a plaguicidas y 78 individuos no expuestos ocupacionalmente a plaguicidas. A ambos grupos de estudio se les realizó historia clínico-laboral, exploración física completa, antropometría (peso, talla e IMC), toma de signos vitales y toma de muestra sanguínea para la realización de biomarcadores de estudio (estrés oxidativo e inmunotoxicidad).

4.1.1. Análisis descriptivo

4.1.1.1. Características de la población de estudio

En el presente estudio participaron voluntariamente 151 individuos que cumplieron con los criterios de inclusión, de los cuales 78 son personas no expuestas ocupacionalmente, Grupo Testigo (GT) y 73 personas ocupacionalmente expuestas (POE). Ambos grupos de estudio con intervalo de edad similares, entre 23-82 años, igualmente el estado marital (testigo = 25 solteros, 53 casado; POE = 19 solteros, 54 casados). En cuanto a la distribución por sexo se mostró mayormente la participación de las mujeres, lo que se ve reflejado en el porcentaje de mujeres en ambos grupos de estudio con un 78% para la GT y 58% para la POE.

De acuerdo con la Tabla 5, el grupo testigo presentó un grado académico más alto en comparación con el grupo de POE, asimismo se puede observar que el grupo POE realiza múltiples ocupaciones además de la agricultura. El mayor porcentaje del POE está representado por las amas de casa, que realizan actividades de en sus hogares, así como en el campo. Estas dobles labores podrían facilitar la exposición de los miembros de la familia, debido a las pocas o nulas medidas de protección y prevención al encontrarse en contacto con plaguicidas, siendo de especial interés los grupos vulnerables (niños, embarazadas, adultos mayores).

Tabla 5 Características de los grupos de estudio

	GT (78)	POE (73)
*Sexo (Hombre : Mujer)	(17:61)	(31:42)
Edad	23-82	22-80
*Escolaridad		
Educación básica	25	34
Educación media	42	36
Educación superior	11	3
Ocupación		
Estudiante	2	4
Empleado	24	18
Obrero	6	5
Ama de Casa	42	37
Otro	4	9

*Diferencia significativa entre grupos de estudio $p < 0.005$

4.1.1.2. *Historia clínica: factores de riesgo y antecedentes inmunológicos*

El objetivo principal de la aplicación de la historia clínica fue recolectar datos característicos de ambos grupos de poblaciones, y determinar si existen factores de riesgo que puedan aumentar la posibilidad de efectos nocivos a la salud, como tabaquismo, alcoholismo, vacunación incompleta entre otros. En ambos grupos de estudio no se presentó consumo de drogas lícitas e ilícitas, cabe mencionar que se calculó el consumo de alcohol al día (ver *Ecuación 2*) y tabaquismo anual (ver *Ecuación 3*) de acuerdo con la OMS, incluyendo en el estudio a aquellas personas que presentaran índices ≤ 10 ya que por debajo de este nivel no se han reportado efectos crónicos adversos a la salud (World Health Organization (WHO), 2011, 2018).

Ecuación 2

$$\text{Índice de consumo de alcohol} = \frac{(\text{ml de la bebida al día})(\text{graduación de alcohol})(0.8)}{100}$$

Ecuación 3

$$\text{Índice de tabaquismo} = \frac{(\text{número de cigarrillos al día})(\text{años})}{20}$$

El nivel socioeconómico de ambas poblaciones se encuentra en media baja con un porcentaje similar de aproximadamente 60% (ver Figura 6), para el grupo POE la tendencia es hacia nivel socioeconómico bajo en comparación con el grupo testigo el cual tiene una tendencia hacia el nivel socioeconómico medio. Dicho indicador es importante ya que pertenecer a un nivel socioeconómico bajo dificulta satisfacer las necesidades básicas como alimentación, higiene, educación, entre otros factores determinantes que pueden provocar desnutrición e inmunosupresión aumentando el riesgo de efectos nocivos a la salud al exponerse a plaguicidas.

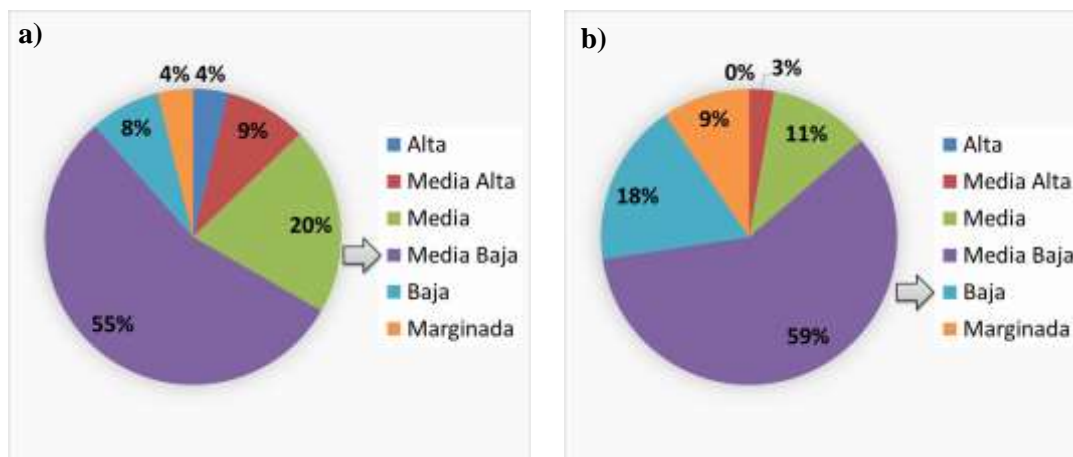


Figura 6 Nivel socioeconómico

En el gráfico se muestra el nivel socioeconómico de los grupos de estudio: (a) grupo testigo y (b) grupo POE.

Otro factor importante es la inmunización activa, ya que la correcta aplicación disminuye el riesgo de infecciones prevenibles por vacunación. El 96.1% del grupo testigo presenta un esquema de vacunación completo en contraste con el 79.5% de la POE, quienes el 20.5 tiene un esquema de vacunación incompleto o nulo, aumentando el riesgo de efectos nocivos a su salud.

4.1.1.3. Estado de salud de la población: Exploración física, antropometría y toma de signos vitales

A todos los participantes se les realizó una exploración física completa (EF), toma de signos vitales que incluía frecuencia cardíaca (FC), frecuencia respiratoria (FR), tensión arterial sistólica (TAS), tensión arterial diastólica (TAD) y temperatura (temp), así como antropometría básica con toma de peso, talla e índice de masa corporal (IMC). En la exploración física completa se reveló que de la POE 33 eran individuos sanos y 40 individuos con enfermedades en contraste con el grupo control con 77 individuos sanos y 1 individuo con dermatitis asociada a productos de limpieza (ver Figura 7). Las principales enfermedades en los agricultores están relacionadas con alteraciones de la piel, oculares y del tracto respiratorio, destacando la rinitis, la faringitis y la dermatitis; síntomas que se relacionan con exposición a plaguicidas. Según los cuestionarios, solo el 13.7% de los POE informaron tener alergias, el resto lo negaron; sin embargo, el 54.8% del grupo de POE exhibe un tipo de síntomas relacionados con alergias (dermatitis, rinitis, conjuntivitis).

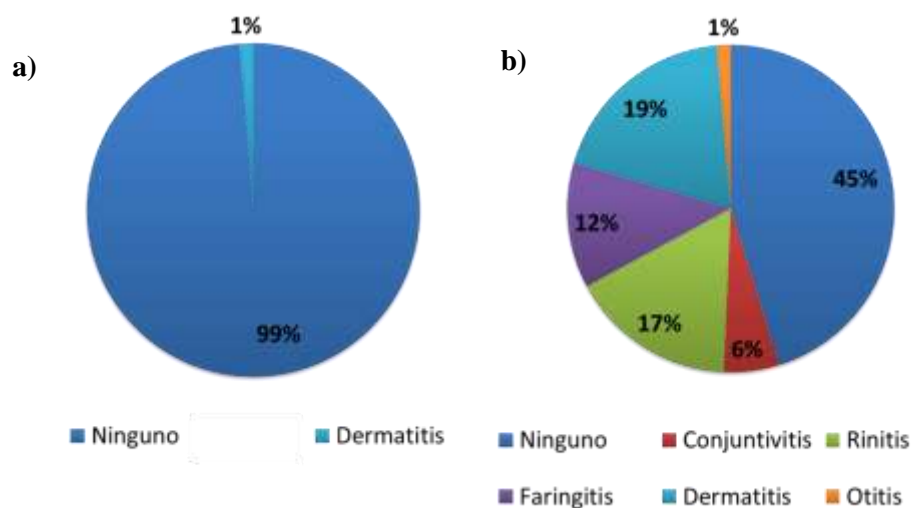


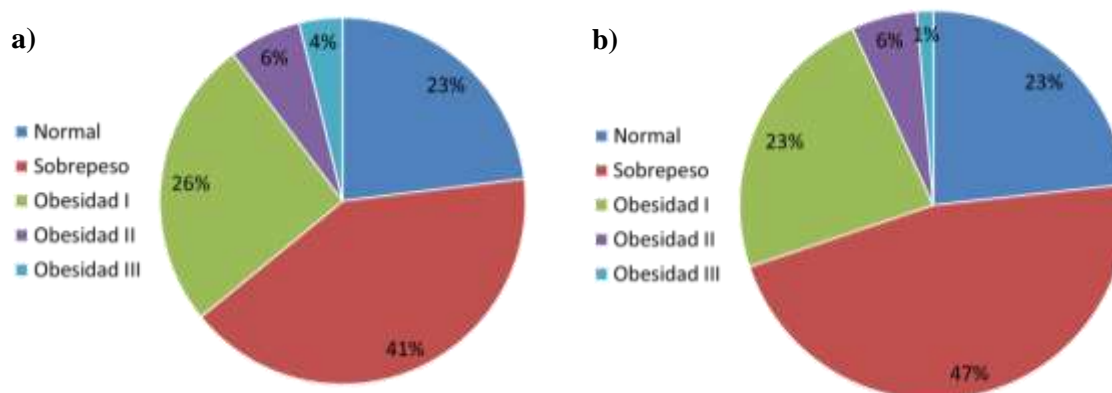
Figura 7 Enfermedades presentes en los grupos de estudio; GT (a) y POE (b)

Exceptuando el IMC, la antropometría y los signos vitales se encontraron dentro de los valores de referencia y sin diferencia significativa entre los grupos de estudio (ver Tabla 6).

Tabla 6 Antropometría y toma de signos vitales en la población de estudio

	Valores de referencia(INEGI, 2009; Kliegman, Stanton, & St. Geme, 2016)	Testigo	POE
Frecuencia Cardíaca (lpm)	60-100	72.91±8.08	73.16±7.94
Frecuencia Respiratoria (rpm)	12-20	19.75±1.40	19.66±1.42
Tensión Arterial Sistólica(mmHg)	90-120	112.17±10.88	116.78±12.02
Tensión Arterial Diastólica (mmHg)	60-80	73.56±8.48	76.89±9.06
Temperatura (°C)	36.5-37.5	36.11±0.29	36.25±0.32
Peso(kg)	68-74	70.82±13.55	72.16±14.36
Talla (m)	1.58-1.64	1.57±0.09	1.60±0.10
IMC (kg/m²)	18.5-24.9	28.77±5.03	28.33±4.32

El índice de masa corporal es importante para ambos grupos de estudio; ya que un alto IMC se relaciona con aumento de enfermedades crónico degenerativas como hipertensión, diabetes mellitus, dislipidemias, entre otras. Para la POE cobra una mayor relevancia no solo por las enfermedades crónico-degenerativas, además se han hecho estudios demostrando que existen plaguicidas con una alta afinidad al tejido graso, por lo que pueden almacenarse, distribuirse en todo el cuerpo humano y aumentar el riesgo de toxicidad aguda y crónica. Solo un 23% de la POE del presente estudio se encuentra con un IMC normal el resto presentan sobrepeso y obesidad en sus diferentes grados.

**Figura 8** Distribución del Índice de Masa Corporal de la población de estudio

a) IMC del grupo testigo y b) IMC de la Población Ocupacionalmente expuesta

4.1.1.4. *Historia laboral: Población Ocupacionalmente Expuesta*

Con la historia clínico-laboral se conocieron las características laborales, 74.6% trabajan por contrato temporal de forma continua (83.1%). Del grupo de mujeres de la POE, que son la mayoría (42/73), el 61.9% se dedica a actividades de campo, desde la siembra hasta la cosecha; el 26,2% realiza la cosecha y la minoría (11,9%) solo fumiga las plantaciones. Respecto al grupo de hombres de la POE, el 70.9% realiza todas las actividades agrícolas excepto fumigar, el 25.8% fumiga las plantaciones y solo el 3.2% recolecta los productos agrícolas. Las actividades con mayor riesgo como fumigar se realizan en un alto porcentaje por el grupo de hombres. Es importante destacar que la historia laboral revela que el total del grupo de POE (100%) no usa regularmente ningún elemento de protección durante las actividades agrícolas, incluida la aplicación de plaguicidas y solo el 27.4% conoce las medidas de seguridad.

El grupo POE tiene una antigüedad laboral de 1 a 60 años, expuesta a una mezcla de plaguicidas de 1 a 12 horas/día por 60 días consecutivos cada año durante la temporada de siembra (junio-julio). El 68.5% de los agricultores durante esta temporada están expuestos a plaguicidas durante 6 a 8 horas/día durante diez años continuos, predominando en el rango de edad de 40 a 60 años. La mayor parte del grupo POE tiene una antigüedad laboral de entre 2 y 10 años (53,4%), el 16,4% entre 11 y 20 años y el resto más de 20 años. El 78% de los agricultores informó que trabajaban entre 5 y 7 días a la semana y el resto menos de 5 días a la semana. La jornada laboral varía de 6 a 10 horas por día (71.23%).

Los voluntarios con menos de 10 años de experiencia laboral, un día laboral de entre 6 y 10 horas durante al menos 6 días a la semana, presentaron el mayor número de síntomas como se muestran en la Figura 7, predominantemente dermatitis, rinitis y faringitis. Además, en este grupo se pudo observar el mayor número de alteraciones en el tracto respiratorio superior, con un promedio de 58.34% de los agricultores con sintomatología. El grupo de POE tiene una exposición a diferentes tipos de plaguicidas. En la Figura 9 se muestra que los plaguicidas mayormente utilizados son de tipo herbicidas, la atrazina y el 2,4-D, que generalmente emplean en una mezcla durante un promedio de 18.7 años (intervalo de 2-60 años) de vida laboral, lo que los predispone a una exposición crónica y aumento del riesgo de efectos adversos a la salud. Dichos plaguicidas se han asociado con efectos negativos en la salud, incluyendo los estudiados en la presente investigación.

Algunos efectos reportados por la ATSDR en el 2017 sobre los plaguicidas ocupados en Calimaya, Estado de México se describen a continuación: La exposición a atrazina en experimentos *in vivo* en ratones ha demostrado una alta actividad de los macrófagos, disminución de monocitos, linfocitos B y linfocitos T; la exposición a 2-4 D en humanos ha ocasionado un decremento del número de linfocitos T citotóxicos y NK, aumento de Ig E y linfocitos B asociados a hipersensibilidad. Se han reportado casos de personas expuestas ocupacionalmente a cipermetrina con incremento de inmunoglobulinas G, M, E y un bajo conteo de linfocitos T asociado a hipersensibilidad dérmica, estos dos últimos efectos también fueron reportados para el glifosato pero en experimentos *in vivo* con ratones y finalmente la exposición a metil paratión ha producido en POE alteraciones en macrófagos, leucocitos, neutrófilos y linfocitos (U.S. Department of Health and Human Services, 2017).

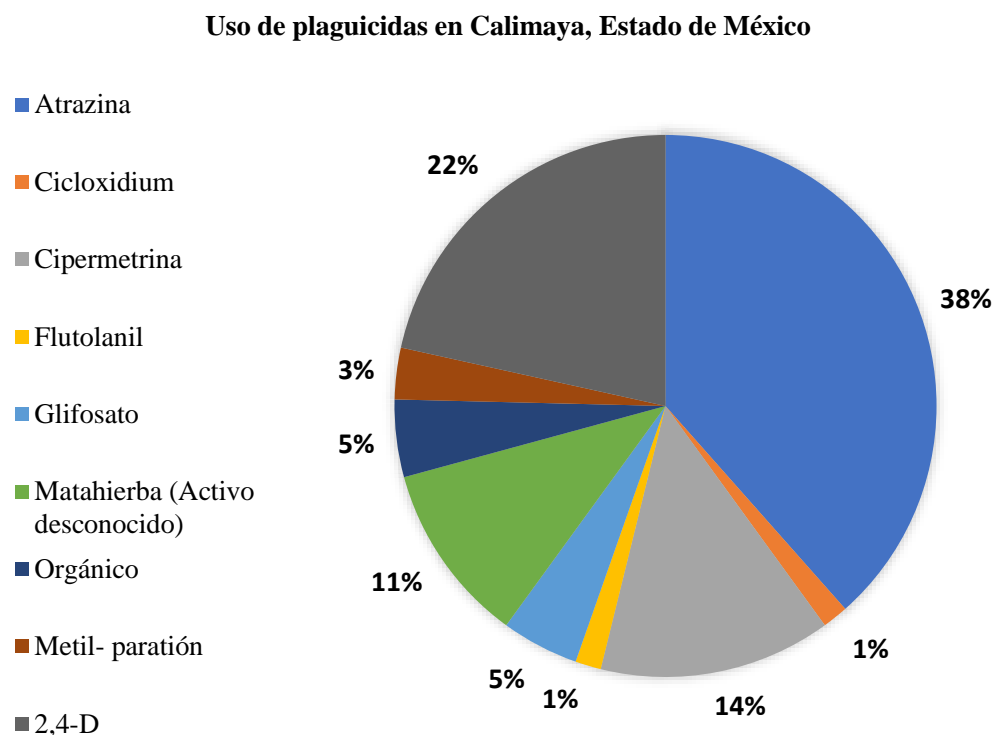


Figura 9 Uso de plaguicidas por agricultores participantes en la investigación en Calimaya, Estado de México

4.1.2. Biometría hemática

La biometría hemática no presento anomalías entre los grupos de estudio. A pesar de la falta de significancia estadística entre los grupos, los valores de la fórmula roja del grupo POE están

mínimamente por debajo de los valores de referencia. Con respecto a la fórmula blanca, se encontró una diferencia significativa para las bandas de neutrófilos ($p = 0,002$) entre los grupos estudiados; con una tendencia a estar superior en la POE. El resto de biomarcadores se encuentran dentro de los valores de referencia (ver Tabla 7).

Tabla 7 Resultados de la biometría hemática de la población de estudio

		Valores de referencia(Monroy, Mellado, Flores, & Vargas, 2010)	GT	POE	Valor p
Fórmula Roja					
Hemoglobina (g/dL) 2690 m sobre el nivel del mar	Mujer	15.3± 2.15	14.29±1.41	13.78±1.37	0.084
	Hombre	17.61±2.31	16.65±2.07	15.47±1.75	0.070
Hematocrito (%)	Mujer	42.4±4.17	43.44±4.00	42.20±3.54	0.255
	Hombre	47.6±4.9	49.65±6.18	46.43±4.74	0.088
Eritrocitos (10 ⁶ /μL)	Mujer	4.62±0.60	4.75±0.40	4.75±0.40	0.582
	Hombre	5.2±0.59	5.41±0.61	5.14±0.57	0.61
Volumen Corpuscular Medio (fL)	Mujer	91.3±8.23	91.42±4.9	89.20±7.25	0.176
	Hombre	90.5±6.86	91.85±6.59	90.57±6.38	0.779
Concentración Media de Hemoglobina (pg)	Mujer	30.8±2.94	30.1±1.94	29.14±2.94	0.067
	Hombre	30.6±2.54	30.81±2.12	30.19±2.19	0.658
Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina (g/dL)	Mujer	33.7±1.00	32.46±3.93	32.62±1.29	0.225
	Hombre	33.8±0.98	33.57±1.48	33.30±1.43	0.211
Fórmula Blanca					
Leucocitos (10 ³ /μL)	3.8-11		6.86 ± 1.65	6.70 ± 2.11	0.165
Neutrófilos (%)	40-82		63.05 ± 8.31	63.87 ± 6.62	0.508
Banda de Neutrófilos (%)	0-3		0.30 ± 0.80	0.01 ± 0.11	0.002 †
Linfocitos (%)	13-50		32.23 ± 7.53	31.32 ± 6.82	0.370
Monocitos (%)	2-13		3.30 ± 0.87	3.16 ± 0.72	0.323
Eosinófilos (%)	0-3		0.99 ± 1.27	1.46 ± 1.71	0.065
Basófilos (%)	0-3		0.10± 0.40	0.15 ± 0.74	0.661
Plaquetas (1/μL)	157,000-407,500		230,392.86± 59,237.53	230,988.24 ± 73,536.60	0.560

Valores de p fueron calculados con U-Mann Whitney

† diferencia significativa ($p < 0.05$)

4.1.3. Biomarcadores de estrés oxidativo: Enzimas antioxidantes

Se obtuvo una muestra de sangre de 11 ml de todos los participantes, para la medición de los biomarcadores de estudio. El diagrama de caja en la Figura 10 muestra la distribución de biomarcadores de estrés oxidativo en los grupos testigo y POE. Hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con respecto a la actividad enzimática SOD y CAT ($p < 0,001$) mayor en los agricultores en comparación con los controles. Mediana y CL 95%, los valores de actividad enzimática de SOD y CAT para el grupo POE fueron 14.92 U / g Hb (de 11.4 a 18.79 U / g Hb) y 15.38 U / g Hb (de 12.37 a 17.48 U / g Hb) respectivamente; para el grupo control fueron 6.21 U / g Hb (de 5.30 a 8.19 U / g Hb) y 10.14 (de 8.68 a 12.31 U / g Hb) respectivamente. La actividad enzimática de SOD para el grupo de POE fue 1.6 veces mayor que el grupo de control y 1.4 veces para la actividad enzimática CAT más alta que el grupo de control.

En los niveles de LIPOX es posible observar el incremento de los valores del grupo de POE con respecto al grupo de control. La mediana de los niveles de LIPOX para el grupo POE se obtuvo de 26.86 nmol / g Hb (de 22.98 a 31.98 nmol / g Hb) y para el grupo control fue de 25.15 nmol / g Hb (22.66 a 27.08 nmol / g Hb), sin embargo, no presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.167$).

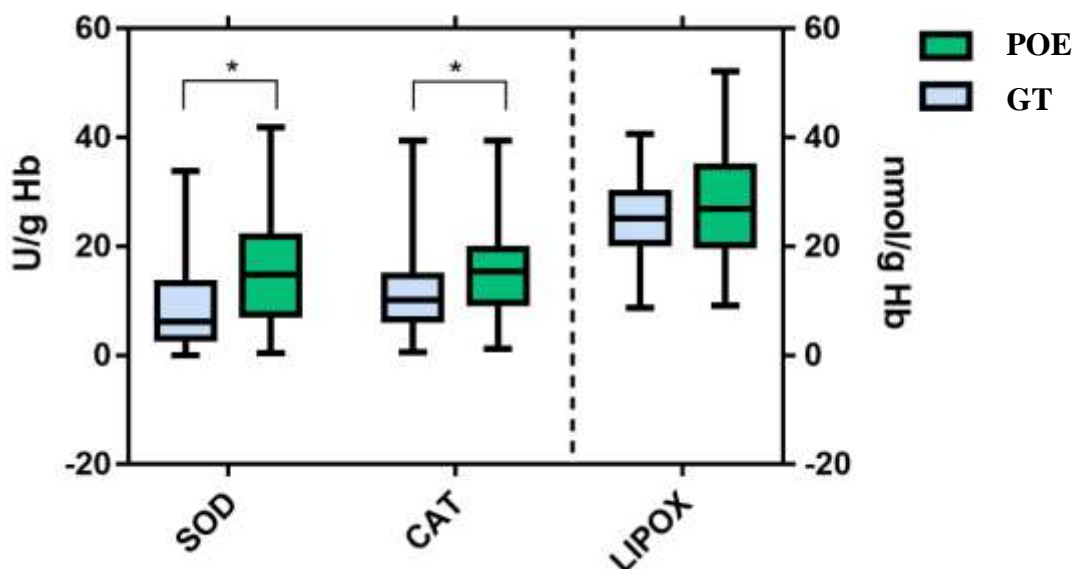


Figura 10 Biomarcadores de estrés oxidativo del GT y la POE

* Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con U-Mann Whitney ($p < 0.05$)

El grupo POE con una antigüedad laboral de <5 horas presentó la mayor actividad enzimática de los biomarcadores de estrés oxidativo (SOD 15.30 ± 8.81 U / g Hb; CAT 15.94 ± 7.60 U / g Hb y LIPOX 28.22 ± 10.85). Con respecto a los grupos por días hábiles, los agricultores con entre 2 y 3 días hábiles tienen niveles altos de biomarcadores de estrés oxidativo (LIPOX 29.40 ± 7.52 mmol / g Hb y CAT 17.46 ± 7.2 U / g Hb; SOD 19.84 ± 12.31 U / g Hb respectivamente). Lo cual sugiere un leve aumento en el estrés oxidativo de la POE, con una respuesta adaptativa del sistema antioxidante para contrarrestar los efectos perjudiciales del estrés oxidativo sostenido por la exposición crónica a plaguicidas.

4.1.4. Inmunoglobulinas

Los resultados de las inmunoglobulinas de los aplicadores de plaguicidas ($n = 25$), revelan diferencias estadísticamente significativas para Ig G ($p < 0.05$) e Ig E ($p < 0.05$) con el grupo de control, no así para Ig M ($p > 0.05$). Los valores de control de las inmunoglobulinas estaban dentro del rango de valores de referencia (ver Tabla 8). Los valores de Ig G e Ig E para el grupo POE superaron los valores de referencia.

Tabla 8 Resultados de inmunoglobulinas en las poblaciones de estudio

	Valores de referencia(Spinreact, 2011b, 2011a, 2011c)	GT	POE	<i>p</i> value
Ig G (mg/dL)	600-1700	1448.00 ± 215.62	1804.10 ± 530.97	0.004 †
Ig M (mg/dL)	40-230	100.03 ± 36.37	121.20 ± 88.29	0.277
Ig E (UI/mL)	≤ 350	136.16 ± 45.06	437.66 ± 397.68	0.004 †

Valores de *p* fueron calculados con U-Mann Whitney

† diferencia significativa ($p < 0.05$)

Además, el 72% de los voluntarios presentan síntomas (7 faringitis, 4 dermatitis, 3 rinitis, 3 conjuntivitis y 1 otitis) relacionados con inmunoglobulinas fuera de los valores de referencia (IgG 1867.4 ± 531.8 , IgM 131.91 ± 97.73 , IgE 493.52 ± 446.66). Este grupo tiene una antigüedad laboral de 12.61 ± 9.7 años, expuesto a una mezcla de plaguicidas mencionada anteriormente por 6.2 ± 2.9 horas / día por 60 días consecutivos cada año durante la temporada de siembra (junio-julio).

Tabla 9. Relación lineal de los biomarcadores con el tiempo de exposición del grupo POE.

	Tiempo de exposición (r, p)	CAT (r, p)	SOD (r, p)	LIPOX (r, p)
IgG	0.015, 0.178	-2.012, 0.896	-5.502, 0.601	-11.387, 0.526
IgM	-0.002, 0.389	-4.023, 0.103	-1.932, 0.267	-2.195, 0.467
IgE	-0.008, 0.369	-19.096, 0.106	-11.729, 0.152	6.032, 0.678
Tiempo de exposición (r, p)	-	0.000, 0.138	0.000, 0.265	0.000, 0.218

Adicionalmente, existe una correlación débil ($r = 0.40$, $p = 0.044$) entre las horas de exposición y los biomarcadores de inmunotoxicidad (eosinófilos). No existe una correlación entre los biomarcadores de estrés oxidativo e inmunotoxicidad con el tiempo de exposición (ver Tabla 9). Aunque no existe una correlación entre los síntomas y los biomarcadores, más del 50% del grupo de POE con exposición prolongada (> 10 horas / día, > 7 días / semana, > 30 años) muestra alteraciones dermatológicas y respiratorias; además de eso, la mayoría del grupo POE presenta valores de biomarcadores (SOD, CAT y LIPOX) por encima de la media aritmética. No fue posible establecer una asociación entre los biomarcadores del estrés oxidativo y las inmunoglobulinas ($p > 0.05$, SOD $r \approx 0.128$, CAT $r \approx 0.275$ y LIPOX $r \approx 0.258$).

CAPÍTULO 5

5. Discusión y conclusiones

5.1. Discusión

La caracterización de las poblaciones de estudio en el presente trabajo reveló que existe un predominio del nivel socioeconómico medio bajo en el grupo de la POE con un grado académico limitado (46.57% de escuela primaria, 49.31% de escuela secundaria y 4.19% de licenciatura). Se ha demostrado en investigaciones previas, que los factores socioeconómicos de la población expuesta desempeñan un papel clave en la inmunotoxicidad, ya que poblaciones con bajo nivel socioeconómico tienen pocas posibilidades de acceder a servicios de salud, mantener una adecuada nutrición, o incluso la compra del equipo necesario para protección (Rahman, 2015; Rahman & Chima, 2018). Asimismo, en este trabajo se observó que la población de estudio de bajos recursos económicos no puede costear el equipo de seguridad necesario para su protección y comprar plaguicidas amigables con el medio ambiente.

Por otra parte, en cuanto a la ocupación de los grupos de estudio es importante resaltar que las amas de casa representan la mayoría. En el grupo POE el 78.57% forma parte de una familia, esta situación aumenta el riesgo de exposición a todos los miembros de la familia a dosis indirectas de plaguicidas por diferentes mecanismos de transferencia (Pérez-Herrera et al., 2018). Se necesita más investigación para evaluar los grupos vulnerables (niños, embarazadas, adultos mayores) y determinar si hay algún daño progresivo o alteraciones en la salud.

Se encontró que el grupo POE presenta un esquema de vacunación incompleto o nulo a pesar del apoyo gubernamental gratuito, impidiendo un desarrollo de inmunidad activa artificial (disminución de enfermedades prevenibles por vacunación). A pesar de que no se ha reportado una correlación directa entre un esquema de vacunación incompleto y una mayor predisposición a daño por plaguicidas, si se han reportado que una persona con un sistema inmunológico alterado es más susceptible a los efectos negativos por exposición crónica a plaguicidas (Aroonvilairat et al., 2015; Mwanga et al., 2016). Por lo que un nulo o incompleto esquema de vacunación predispone a adquirir enfermedades afectando al sistema inmunológico.

Con referencia a la antropometría, se observó en ambos grupos de estudio la tendencia al sobrepeso y los diversos tipos de obesidad. Este parámetro aumenta el riesgo de enfermedades crónico-degenerativas lo que ocasionaría la presencia de un sistema inmune comprometido (Bray, Kim, & Wilding, 2017; Minghelli, Oliveira, & Nunes, 2015). Asimismo, se ha comprobado que la obesidad por si misma ocasiona inmunocompromiso por lo que la POE tiene un mayor riesgo de efectos nocivos a la salud (Francisco et al., 2018). Es importante mencionar que algunos tipos de plaguicidas pueden almacenarse en el tejido adiposo, provocando una exposición prolongada y continua (Genuis, Lane, & Birkholz, 2016).

La exploración física reveló que en cuanto a los signos vitales no se encontraron diferencias significativas entre grupos de estudio. Con respecto a la sintomatología referida por los individuos participantes, en el grupo POE se encontraron la presencia de síntomas clínicos en el tracto respiratorio superior (faringitis, rinitis) y signos oculares (conjuntivitis). En contraste, el grupo testigo no refirió ninguna sintomatología. La sintomatología del grupo POE puede atribuirse a la ausencia o deficiencia de medidas de seguridad utilizadas durante la manipulación de plaguicidas como se ha comentado en previas investigaciones (García-García et al., 2016). Sin embargo, es importante mencionar que para lograr la afirmación de causalidad es necesario desarrollar otros diseños de estudios que permitan la fortaleza de esta asociación.

Por otro lado, se comprobó que existe una diferencia estadística en los biomarcadores de estrés oxidativo (SOD, CAT) en el grupo de POE en comparación con el grupo de testigo lo cual podría atribuirse a la exposición a plaguicidas, similares resultados han sido reportados previamente (Costa et al., 2015; Olatunbosun et al., 2014; Simoniello et al., 2010). La exposición a plaguicidas aumenta la generación de especies tóxicas de oxígeno reactivo (ROS), lo que ocasiona una alteración de los biomarcadores del estrés. Las reacciones de reducción-oxidación

dentro de los eritrocitos provocadas por la presencia de ROS desencadenan un proceso de interrupción por parte del sistema antioxidante; sin embargo si se supera la capacidad de los mecanismos de defensa antioxidante, se permite el daño en las macromoléculas como ADN, ARN y proteínas (R. Kaur, 2018; R. P. Kaur et al., 2015). Además, el daño oxidativo afecta la viabilidad celular provocando una reacción adaptativa de la médula ósea que conduce a un incremento anormal en la concentración de los neutrófilos en banda para el grupo de POE. Las alteraciones del sistema inmunitario en el sistema antioxidante enzimático y no enzimático evitan la eliminación de los radicales libres y las ROS, lo que hace que el grupo de POE sea más susceptible a la enfermedad. Existe múltiples investigaciones en las que se han reportado alteraciones similares en los biomarcadores oxidativos (Abhijith, Ramesh, & Poopal, 2016; Bini Dhouib et al., 2016b; Cattelan et al., 2018; Hernández et al., 2013).

En relación a los niveles de inmunoglobulinas G y E entre el POE y el grupo de control denotan alteraciones en la inmunidad humoral. Los resultados de las inmunoglobulinas del grupo de control se encontraron entre los valores de referencia, en contraste con el grupo de POE que estaban por encima de los valores de referencia (con un máximo de 1.37 veces). Se han reportado resultados similares (Castillo-Cadena et al., 2013; Mecdad et al., 2011), en una población expuesta crónicamente a plaguicidas se evaluó el estrés oxidativo y los efectos inmunomoduladores, encontrando que la exposición crónica a los plaguicidas genera un daño oxidativo significativo, así como un sistema antioxidante comprometido.

El incremento de las inmunoglobulinas está relacionado con enfermedades del tracto respiratorio superior e inferior, como sinusitis, rinofaringitis, bronquitis, asma, entre otras. Además, las alteraciones de la inmunoglobulina E se han asociado con la presencia de alergias en POE (Aroonvilairat et al., 2015). Cabe señalar que los plaguicidas que más utilizan el grupo de POE (atrazina y 2,4-D) se han relacionado con la disminución de la actividad inmune celular (monocitos, linfocitos B y T) y el aumento de la hipersensibilidad (IgE y alergias), que fueron concordante con esta investigación (Lerro et al., 2017; C. Zhang et al., 2018). Por lo tanto, los agricultores expuestos a plaguicidas podrían ser más susceptibles a las enfermedades respiratorias crónicas, lo que lleva a un incremento de los servicios de salud pública, costos familiares y una disminución en la calidad de vida (Carvalho, 2017).

A partir de los resultados del estudio se puede observar que existen altos niveles de estrés oxidativo, alteraciones del sistema antioxidante y del sistema inmunológico en los agricultores

expuestos crónicamente a plaguicidas del municipio de Calimaya. Además, se encontró un aumento de síntomas respiratorios en la POE, a pesar de que estos son inespecíficos, son concordantes con múltiples investigaciones de campo donde la exposición a plaguicidas aumenta la incidencia de enfermedades respiratorias (Hoppin et al., 2008; Kim et al., 2017; Mwanga et al., 2016). Para minimizar la exposición, los efectos negativos a la salud de la POE es necesario entrenar a los agricultores para que usen medidas de seguridad durante la manipulación de plaguicidas. A pesar de que el grupo POE comenzó a utilizar plaguicidas ecológicos durante la época de siembra este año, los plaguicidas orgánicos persistentes son empleados con mayor frecuencia.

5.2. Conclusiones

- La caracterización de la población de estudio y la anamnesis revelaron que el grupo de la POE tiene un nivel socioeconómico bajo lo que impide costear la compra de equipo de seguridad adecuado para la manipulación de plaguicidas, así como la compra de plaguicidas amigables con el ambiente.
- El grupo de la POE se encuentra principalmente compuesto por mujeres que desempeñan actividades en el campo y en el hogar simultáneamente. Lo que aumenta el riesgo de las familias de sufrir una exposición indirecta a plaguicidas y daños a la salud.
- Ambas poblaciones de estudio presentaron sobrepeso lo que aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades crónico degenerativas, particularmente para el grupo de la POE esto representa una mayor susceptibilidad a efectos nocivos a la salud por exposición a plaguicidas.
- El grupo de la POE presentó múltiples síntomas del sistema respiratorio, piel y tegumentos. Esto puede estar asociado a la exposición crónica a los plaguicidas que son empleados por los agricultores participantes, cabe destacar que los plaguicidas con mayor frecuencia de uso fueron atrazina y 2,4-D utilizados en mezcla.
- Las alteraciones encontradas por los biomarcadores de inmunotoxicidad mostraron alteraciones en el sistema inmunológico humoral asociado a la exposición de plaguicidas.

- Los resultados de los biomarcadores de estrés oxidativo sugieren un aumento en el estrés oxidativo en el grupo de la POE, con una respuesta adaptativa del sistema antioxidante. La inducción de estrés oxidativo y alteración en el sistema antioxidante son efectos tóxicos que pueden atribuirse a la exposición a plaguicidas.
- Existe una correlación débil entre el tiempo de exposición a plaguicidas y algunos biomarcadores de inmunotoxicidad, la cual puede ser asociada al uso de plaguicidas. Sin embargo, para establecer la correlación directa entre efectos nocivos a la salud por exposición a plaguicidas es necesario realizar más investigaciones del tipo longitudinal, realizar una caracterización más amplia de la población, así como, la medición de biomarcadores de exposición.

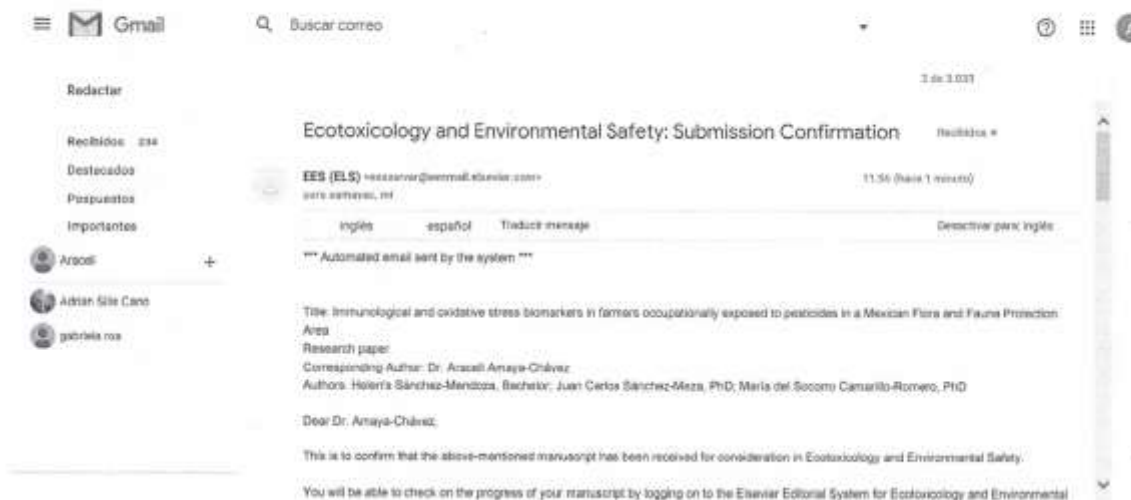
Además de las implicaciones para la salud por exposición a plaguicidas, es importante mencionar que estos productos químicos no deben usarse en las Áreas de Protección de la Flora y Fauna, ya que su uso se encuentra regulado por la Federación Mexicana. Por lo anterior se recomienda encarecidamente a la población en general y especialmente a los agricultores, estar al tanto del riesgo en salud pública del uso de plaguicidas. Los trabajadores rurales y las autoridades locales deben promover la agricultura sostenible para evitar implicaciones negativas para el ambiente y la salud de la población que habita en la zona aledaña del APFF del "Nevado de Toluca".

CAPÍTULO 6

6. Artículo

6.1. Immunological and oxidative stress biomarkers in farmers occupationally exposed to pesticides in a Mexican Flora and Fauna Protection Area.

Ecotoxicology and Environmental Safety: Submission Confirmation - amayacha8789@gmail.com - Gmail Página 1 de 2



Immunological and oxidative stress biomarkers in farmers occupationally exposed to pesticides in a Mexican Flora and Fauna Protection Area

Names of the authors: Sánchez-Mendoza Helen's Irais¹, Amaya-Chávez Araceli¹, Sánchez-Meza Juan Carlos¹, Camarillo-Romero María del Socorro².

¹*Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan S/N, Toluca, Estado de México 50180, MEXICO.*

²*Centro de Investigaciones en Ciencias Médicas, Universidad Autónoma del Estado de México, Jesús Carranza 205, Col. Universidad, 50130 Toluca, MEXICO.*

Abstract

Aim. In the present study it is reported the analysis of the state of health of farmers chronically exposed to pesticides mixtures through oxidative stress and immunological biomarkers in an official fauna and flora protection area: "Nevado de Toluca" (APFFs, in Spanish) in Calimaya, Mexico. **Material and methods:** 73 occupationally exposed to pesticides persons (POE) and 78 control patients participate in this study. Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), lipid peroxidation (LIPOX) were used as stress oxidative biomarkers; immunoturbidimetric assays for IgG, IgM, IgE and blood biometry was done to evaluate immunotoxicity alterations in farmers. Social characteristics information was collected from all patients. **Results.** Patients ages ranged from 23-82 and 22-80 for control (17 men, 61 women) and POE (31 men, 42 women) groups respectively. There was a statistically significant difference between groups regarding SOD and CAT ($p < 0.001$; Mann-Whitney U test) increased in farmers compared to controls, except for LIPOX ($p = 0.167$; Mann-Whitney U test). Physical exploration characteristics of the studied population were found within reference values. POE group present significant alterations in neutrophils bands, IgG and IgE immunoglobulins in comparison with control group ($p < 0.05$; Mann Whitney U test). Upper respiratory tract (pharyngitis, rhinitis) and ocular signs (conjunctivitis) alterations were detected in 34.24% of POE group. An association was found ($p < 0.05$: Spearman correlation) between IgE values, work seniority and the symptoms described it. **Conclusions:** results reveal high levels of oxidative stress, antioxidant system alterations, ailment immune humoral functions and adverse health effects in POE group due to pesticides exposure.

Keywords: pesticides, immunotoxicity, oxidative stress, biomarkers, farmers.

1. Introduction

The current agriculture demand and the new consumer cultural dynamic has brought consequently an increment in the use of insecticides, fungicides and herbicides. These chemical substances are generally known as pesticides, and its use allows the control, prevention and destruction of pests in agriculture. Correctly employed, the pesticides increased the yielding food production, just in 2016 were used 609.5 kg/ha of pesticides in the worldwide^{1,2}.

Due to its physical-chemical characteristics, pesticides pollute the environment and enter in all trophic levels, therefore all humans are inevitably exposed to a certain quantity of pesticides³. Pesticides toxicity has been widely reported in different studies⁴⁻⁶ and the severity of negative effects depends mainly on concentration, exposition time, pesticide chemical composition, geographical conditions among others⁷⁻⁹.

Farmers are occupationally exposed to pesticides (POE) during mixing and loading application, incrementing the health risk to present different diseases (pulmonary fibrosis, asthma, Parkinson, immunological suppression)¹⁰⁻¹². Within pesticides effects reported in farmers, highlights oxidative stress (Ox) through an increment of reactive oxygen species (ROS), which can cause immunotoxicity (adverse effects on the functioning of both local and systemic immune) hematological and biochemical alteration¹³.

Due to highly reactive species are difficult to determine in biological systems (short half-life), different indirect biomarkers have been successfully measured to identify oxidative stress presence. The levels of lipid peroxidation are one of the indirect biomarkers, measure with the aim to determine the peroxidative degradation of polyunsaturated fatty (negative effect of stress oxidative)¹⁴. Another example is the antioxidative enzymes—the superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), reduced glutathione (GSH)—which are responsible to hold homeostasis up between the generation and consumption of reactive intracellular oxygen; alteration in their activity is a toxicity indirect biomarker by pesticides⁵. Previously, epidemiological investigations have shown a strong association between alterations in the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), and lipid peroxidation levels (LIPOX) to pesticide exposition¹³⁻¹⁵.

In Mexico, there are 40 official fauna and flora protection areas (APFFs, in Spanish), with the aim of promoting, guide and preserve the natural Mexican heritage by sustainable paths. Agriculture activities can be developed in APFFs as long as they are not erosive or polluting¹⁶. Recently, was detected in APFF of "Nevado de Toluca" the use of 14 potentially toxic pesticides (organophosphorus, carbamates and organochlorines) by local farmers, particularly in Calimaya, Mexico¹⁷. In this study was analyzed the state of health of POE farmers of the APFF of "Nevado de Toluca" in Calimaya (Mexico) exposed to potential toxic pesticides through determination of immunological and oxidative stress biomarkers (SOD, CAT, LIPOX, blood biometry), besides medical exploration was done, to investigate the presence of immunotoxicity and antioxidant defense alterations.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects characteristics and selection

This longitudinal study was developed in the APFF of "Nevado de Toluca" in Calimaya, State of Mexico, located at parallels 19° 06' and 19° 14' of north latitude; meridians 99° 32' and 99° 44' west longitude (2500 - 4200m altitude; Figure 1). In Calimaya are mainly seeded grains like corn, oats and potatoes. To be considered in this study local farmers required to have at least one year of pesticide exposure. In agreement with Secretary of Economic Development and Agricultural and Tourism Development of the City Council of Calimaya, a total of 151 individuals (volunteers) met inclusion criteria and wanted to participate in the present study. The sample was divided into two groups: POE (n=73) and CONTROL (n=78). Participants with medical history of diabetes mellitus, hypertension, cancer or any chronic disease; addictions (alcohol, drug & tobacco indexes; according to WHO)^{18,19}; and pregnancy were excluded to avoid biases in the study.

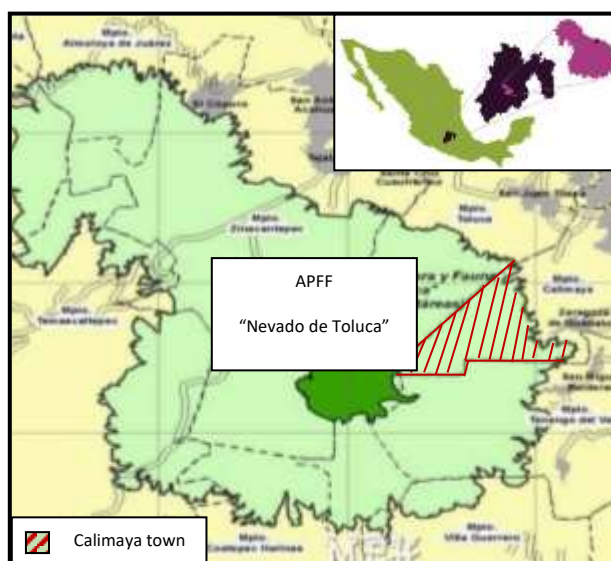


Figure 1. Study location. Map showing Calimaya town inside the APFF “Nevado de Toluca” in the State of Mexico.

All studied groups were surveyed by a questionnaire covering personal history, medical history, with special emphasis on the immunological system. Occupational history included the duration of application of pesticides, kind of pesticides and personal protective equipment used. Health examination to each participant was done by a medical professional, including taking vital signs. All volunteers who accepted to participate signed a written informed consent form. The research was conducted in compliance with the Ethical Principles for Medical Research and was approved by the Ethics and Research Committee of the Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED) of the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx).

2.2. Sample collection

Venous blood sample (10 mL) were collected from all studies subject by venipuncture with vacutainer. The blood sample were collected in a 3 mL tube with heparin for oxidative stress (EOx), one with 3 mL with EDTA for blood count, and the other with 4 mL with separator gel for immunoglobulins. The blood samples were centrifugated at 3500 rpm for 15 minutes to separate serum, which was kept frozen at -20 °C for immunological assays. For the oxidative stress biomarkers, the samples were kept under refrigeration to 4-8 °C for periods no longer to 6 days for its processing.

2.3. Blood biometry

Leucocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, basophils and platelets were determined with a flow cytometry equipment (Microlab ABX equipment, USA). The differential count of white cells was made on a blood smear stained with Wright solution by proceeding the microscopic method standard. Additionally, hematocrit, hemoglobin, erythrocytes, mean cellular volume were determined.

2.4. Oxidative stress biomarkers

For oxidative stress, Catalasa (CAT), superoxidative dismutase (SOD) and lipoperoxidation (Lipox) were determined in heparinized blood samples. The results are presented as unit per gram hemoglobin. CAT, SOD and LIPOX were determined accordingly to previously reported methods by Radi *et al.*, (1991), Misra and Fridovich (1972) and Büege and Steven, (1978) respectively.

2.4.1. CAT

Decomposition of hydrogen peroxide into oxygen and two water molecules by catalase were measured. Briefly, a 200 μ L solution of peroxide was added to a mixed solution of 1 mL of buffer solution (pH 7.4) and 20 μ L of homogenized erythrocytes sample in a quartz cuvette. Absorbance was measured at 240 nm and concentrations were determined by the decreased of absorbance from 0s to 30s.

2.4.2. SOD

The method quantifies in lysate erythrocytes the inhibition of auto-oxidation of adrenaline to adrenochrome (brown color) in basic medium. A 600 μ L solution of adrenaline was added to a homogenous mixed sample of 150 μ L erythrocytes solution and 750 μ L carbonates buffer solution (50 mM sodium bicarbonate/sodium carbonate, EDTA 0.1mM, pH 10.2) in a quartz cuvette. The absorbances were measured at 0 s, 30 s and 5 mins at 480 nm.

2.4.3. LIPOX

The reddish coloration, that is a product of the reaction of thiobarbituric acid with malondialdehyde (final product of lipid peroxidation), was determined. 250 μ L of blood sample

was mixed with 250 μL trichloroacetic acid solution and heated at 37 °C during 30 minutes. Posteriorly, a 1 mL of thiobarbituric acid was added and boiled during 45 minutes, then cooled with ice for 15 minutes. The absorbances were measured immediately the cooler process at 535 nm.

2.5. Immunoglobulins

Immunoturbidimetric assays (IgG, IgM, IgE-turbilatex, SPINREACT[®]) were used for quantitative determination of Ig E, G y M in plasma in the groups of study. Samples absorbances were determined by a Roche spectroscopy (Hitachi 902, Mannheim, Germany). A standard calibration curve of each immunoglobulin was obtained using standard procedures with a general protein calibrator (PROT-CAL, SPINREACT[®]). The thermostable cuvettes and reagents (diluent and antibody) were heated at 37 °C and the spectroscopy equipment was adjusted to zero with physiological solution.

2.5.1. IgE assay.

The assay was realized with 650 μL of diluent (glycine buffer, sodium azide 0.95g/L, pH 8.3) and 350 μL of reagent latex (latex particles coated with mouse IgG antihuman IgE, sodium azide 0.95g/L, pH 7.3) were added to 15 μL of plasma sample into a cuvette and mixed. The absorbance sample was read (at 570 nm) immediately (A_0) and after 5 minutes (A_1) in the spectroscope ²³.

2.5.2. IgG assay.

For the preparation of the IgG sample 800 μL of diluent (Tris buffer 20 mmol/L, PEG 8000, sodium azide 0.95g/L, pH 8.3) was added to 10 μL of plasma sample into a cuvette, mixed and read it at 650 nm (A_0); after 200 μL of antibody (goat serum, antihuman IgG, sodium azide 0.95g/L, pH 7.5) was incorporated to the mixed sample and stabilized for 2 minutes, then the absorbance was read it (A_1) ²⁴.

2.5.3. IgM assay.

To evaluate IgM, 800 μL of diluent (Tris buffer 20 mmol/L, PEG 8000, sodium azide 0.95g/L, pH 8.3) was added to 10 μL of plasma sample into a cuvette, mixed and read it at 340 nm (A_0); after, 200 μL of antibody (goat serum, antihuman IgM, sodium azide 0.95g/L, pH 7.5) was incorporated to the mixed sample and stabilized for 2 minutes, then the absorbance was read it (A_1) ²⁵. The concentrations (mg/dL, U/mL for IgM/IgG and IgE respectively) of the

immunoglobulin samples were calculated by standard interpolation of Δ_{abs} ($A_1 - A_0$) using the calibrations curves.

Statistical analysis

A descriptive analysis of the groups (POE & control) was carried out using mean, SD and percentiles. A normality and homogeneity variance tests were done for each group (Kolmogorov-Smirnov And Levene) to select the corresponding parametric and non-parametric test to the data. The non-parametric Mann-Whitney U test ($p < 0.05$) was used to compared levels of biomarkers of oxidative stress (CAT, SOD) between POE and control groups. The mean t -student was used to compare LIPOX and immunological biomarkers in the groups of study ($p < 0.05$). Spearman correlation test was used to determine the significant correlation between the variables of interest. SPSS statistical software package (SPSS 24.0.0, USA) was used for all the statistical analysis.

3. RESULTS

Socio-demographic criteria of the study groups

The descriptive analysis of the questionnaires is shown in table 1. Volunteers ages ranged from 22-80 and 23-82 for control (17 men, 61 women) and POE (31 men, 42 women) groups, respectively. The marital status was similar from both groups (Control = 25 single, 53 married; POE = 19 single, 54 married). Control group present higher scholar grade ($p = 0.001$) in comparison with POE group; distributed as follows: elementary school = 25:34, high school = 42:36 and bachelor degree = 11:3 (Control : POE), 46.57% of the POE barely have basic education. Questionnaires revealed that POE group has multiple occupations besides agriculture (student=4, clerk=18, laborer=5, housewife=37, microentrepreneurs=9). The majority of the POE is represented for housewives, who make several activities both in the field and at the house, facilitating the exposition of members family (especially children). Control group presents a similar occupations distribution like 2 students, 24 clerks, 6 laborers, 42 housewife and 4 microentrepreneurs excluding agriculture activities.

Table 1. Characteristics of the studied population in Calimaya, Mexico.

		CONTROL (n = 78)	POE (n = 73)
Addictions	Smokers (Smoking index)	8 (0.36)	6 (0.15)
	Alcohol consumes (g/day)	5(10.7)	9 (1)
	Drugs (g/day)	0 (0)	0 (0)
Transfusions (number of transfusions)		1(1)	2(1)
Vaccination scheme	Full	75	58
	None	3	12
	Incomplete	0	3
	High	3	0
Socioeconomic level (AMAI²⁶)	Middle high	7	2
	Middle	16	8
	Middle low	43	43
	Low	6	13
	Very low	3	7
	Normal	18	17
BMI (Body mass index-WHO²⁷)	Overweight	32	34
	Obesity I	20	17
	Obesity II	5	4
	Obesity III	3	1

Of the women POE group, who are the majority (42/73), 61.9% are dedicated to field activities, from planting to harvesting; 26.19% perform harvesting and the minority (11.9%) only fumigate the plantings. Regarding the men POE group, 70.9% make all the agriculture activities except fumigate, 25.8% fumigate the plantings and only 3.2% recollected the agriculture products. The activities with a major risk like fumigate are realized in a high percentage by the men group. It is important to highlight that the survey reveals that POE group (100%) does not use regularly any protection items during agriculture activities including pesticides application, only 27.4% know the security measures. The POE group has working seniority from 1 to 60 years, exposed to a mix of pesticides for 1 to 12 hours/day per 60 days consecutive every year during planting season (June-July). The 68.49% of the farmers during this season are exposed to pesticides for 6 to 8 hours/day for ten years continuous, predominating the range of age for 40 to 60 years old. Most of the POE group has a working seniority of between 2 and 10 years (53.4%), 16.4% between 11 to 20 years and the rest more than 20 years. 78% of farmers said they worked between 5 to 7 days a week and the rest less than 5 days a week. The working day varies between 6 to 10 hours per day (71.23%).

The volunteers with less than 10 years of working experience, a working day of between 6 and 10 hours for at least 6 days a week, presented the greatest number of symptoms shown in Figure 2, predominantly dermatitis, rhinitis and pharyngitis. Furthermore, in this group could be observed the highest number of alterations in the upper respiratory tract, with an average of 58.34% of the farmers with symptomatology. The POE group with a working seniority of <5 hour presented the highest enzymatic activity of oxidative stress biomarkers (SOD 15.30 ± 8.81 U/g Hb; CAT 15.94 ± 7.60 U/g Hb and LIPOX 28.22 ± 10.85). Regarding the groups for working days, farmers with between 2 to 3 working days have high levels of oxidative stress biomarkers (LIPOX 29.40 ± 7.52 mmol/g Hb and CAT 17.46 ± 7.2 U/g Hb; SOD 19.84 ± 12.31 U/g Hb respectively). The POE group have an exposition to different kind of pesticides, the Figure 2 shows that the more frequently pesticides used is atrazine and 2,4-D which are usually employed in a mixture.

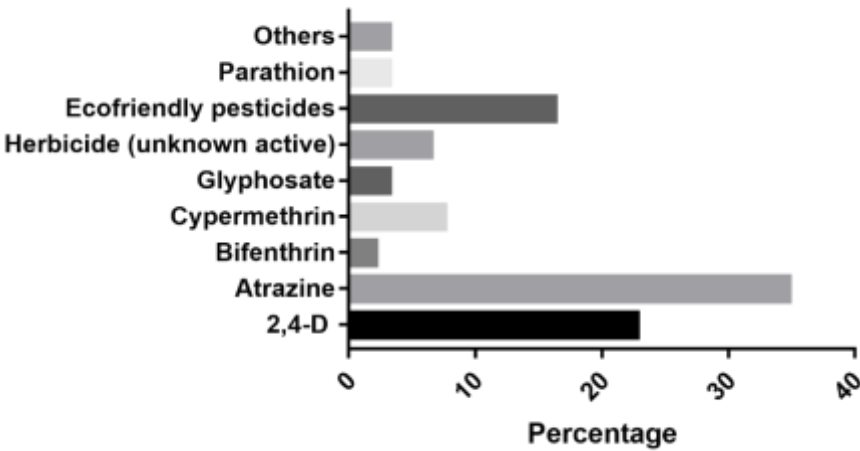


Figure 2. Pesticides used in the agriculture of Calimaya, Mexico.

There were not addictions in both groups of study. Regarding the vaccines is important to mention the incomplete or null vaccination scheme in the POE (20.5%). POE group reported 33 healthy patients and 40 patients with diseases in contrast to control group with 77 healthy patients and 1 patient with dermatitis (figure 3). The main diseases in farmers are related to alterations of the skin, mucous membranes and respiratory tract, highlighting rhinitis, pharyngitis and dermatitis. According to the questionnaires only 13.69% of POE reported having allergies, the rest of both groups of study deny them; notwithstanding the 54.8% of the POE group exhibit a kind of symptoms related with allergies, like dermatitis, rhinitis, conjunctivitis.

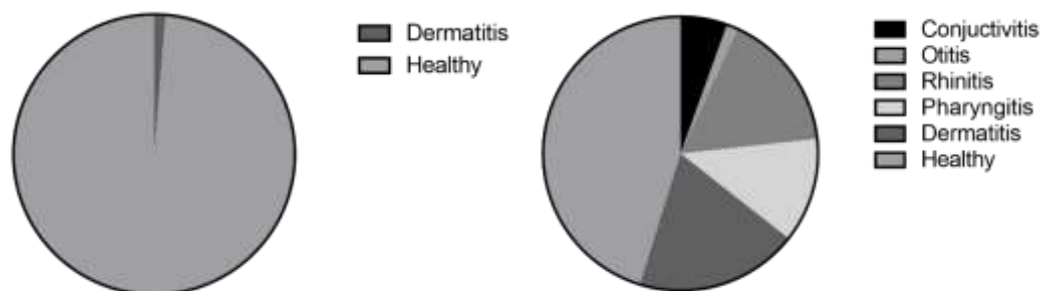


Figure 3. Control group (left) and POE group (right) diseases reported in the study.

The patient's physical exploration characteristics of the studied population are summarized in Table 2. Respect vital signs, the heart rate and temperature in both groups are within reference normal values, nonetheless, the respiratory rate, systolic blood pressure and diastolic blood pressure were slightly higher than normal range with emphasis on the POE.

Table 2. Means and standard deviation of the physical exploration characteristics of studied population

PARAMETERS (Mean)	REFERENCE VALUES ^{28,29}	CONTROL	POE
Heart rate (bpm)	60-100	72.91±8.08	73.16±7.94
Respiratory rate (rpm)	12-20	19.75±1.40	19.66±1.42
Systolic blood pressure	90-120	112.17±10.88	116.78±12.02
Diastolic blood pressure	60-80	73.56±8.48	76.89±9.06
Temperature (°C)	36.5-37.5	36.11±0.29	36.25±0.32
Weight (kg)	68-74	70.82±13.55	72.16±14.36
Height (m)	1.58-1.64	1.57±0.09	1.60±0.10
BIM (kg/m ²)	18.5-24.9	28.77±5.03	28.33±4.32

Blood biometry of the study groups

The blood biometry failed to highlight abnormalities between studied groups, only a significant difference in values men hemoglobin test was found. Despite statistical significance lack between groups, the red formula values of POE group were underneath to the reference values. Regarding the white formula, a high significant difference was found for neutrophils bands ($p = 0.002$) between studied groups; the rest of biomarkers are inside the reference values (Table 3).

Table 3. Blood biometry results of the population of study.

		REFERENCE VALUES ³⁰	CONTROL	POE	<i>p</i> value
<i>Red formula</i>					
Hemoglobin (g/dL)	Women	15.3± 2.15	14.29±1.41	13.78±1.37	0.084
2690 m above sea level	Men	17.61±2.31	16.65±2.07	15.47±1.75	0.070 †
Hematocrit (%)	Women	42.4±4.17	43.44±4.00	42.20±3.54	0.255
	Men	47.6±4.9	49.65±6.18	46.43±4.74	0.088
Erythrocyte (10 ⁶ /μL)	Women	4.62±0.60	4.75±0.40	4.75±0.40	0.582
	Men	5.2±0.59	5.41±0.61	5.14±0.57	0.61
Mean corpuscular volume (fL)	Women	91.3±8.23	91.42±4.9	89.20±7.25	0.176
	Men	90.5±6.86	91.85±6.59	90.57±6.38	0.779
Medium hemoglobin concentration (pg)	Women	30.8±2.94	30.1±1.94	29.14±2.94	0.067
	Men	30.6±2.54	30.81±2.12	30.19±2.19	0.658
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dL)	Women	33.7±1.00	32.46±3.93	32.62±1.29	0.225
	Men	33.8±0.98	33.57±1.48	33.30±1.43	0.211
<i>White formula</i>					
Leucocytes (10 ³ /μL)	3.8-11		6.86 ± 1.65	6.70 ± 2.11	0.165
Neutrophils (%)	40-82		63.05 ± 8.31	63.87 ± 6.62	0.508
Neutrophils Bands (%)	0-3		0.30 ± 0.80	0.01 ± 0.11	0.002 †
Lymphocytes (%)	13-50		32.23 ± 7.53	31.32 ± 6.82	0.370
Monocytes (%)	2-13		3.30 ± 0.87	3.16 ± 0.72	0.323
Eosinophils (%)	0-3		0.99 ± 1.27	1.46 ± 1.71	0.065
Basophiles (%)	0-3		0.10± 0.40	0.15 ± 0.74	0.661
Palates (1/μL)	157,000-407,500		230,392.86± 59,237.53	230,988.24 ± 73,536.60	0.560

P values were calculated by U-Mann Whitney

† Statistically significant ($p < 0.05$)

Oxidative stress biomarkers

Box plot in figure 4 shows the distribution of oxidative stress biomarkers in control and POE groups. There was a statistically significant difference between groups regarding SOD and CAT enzymatic activity ($p < 0.001$) increased in farmers compared to controls. Median and CL 95%, SOD and CAT enzymatic activity values for POE group were 14.92 U/g Hb (of 11.4 to 18.79 U/g Hb) and 15.38 U/g Hb (of 12.37 to 17.48 U/g Hb) respectively; for control group were 6.21 U/g Hb (of 5.30 to 8.19 U/g Hb) and 10.14 (of 8.68 to 12.31 U/g Hb) respectively. SOD

enzymatic activity for POE group was 1.6 times higher than the control group, and 1.4 times for enzymatic activity CAT higher than the control group.

The LIPOX was not a statically significant difference ($p = 0.167$), notwithstanding it is possible to observe the increment of values POE group respect to the control group. The median LIPOX levels for POE group was obtained of 26.86 nmol/g Hb (of 22.98 to 31.98 nmol/g Hb) and for control group was of 25.15 nmol/g Hb (22.66 to 27.08 nmol/g Hb).

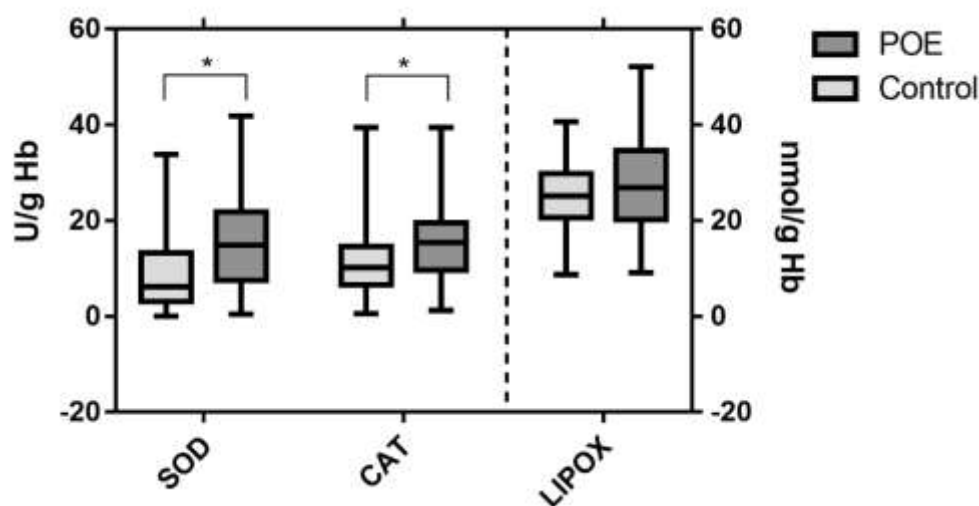


Figure 4. Enzymatic activities of SOD and CAT of farmers (POE) of the APFF and of the control group, exposed to pesticides. *Statistically significant difference between groups with U-Mann Whitney ($p < 0.05$).

Immunoglobulins

Immunoglobulins results of pesticides applicators ($n=25$), reveals statistically significant difference for Ig G ($p = 0.014$) and Ig E ($p = 0.001$) with control group, not so for Ig M ($p = 0.277$). Control immunoglobulins values were inside the reference values range (Table 4). The Ig G and Ig E values for POE group exceeded the reference values.

Furthermore, 72% of volunteers present symptoms (7 pharyngitis, 4 dermatitis, 3 rhinitis, 3 conjunctivitis and 1 otitis) relationated with immunoglobulins outside of reference values (IgG 1867.4 ± 531.8 , IgM 131.91 ± 97.73 , IgE 493.52 ± 446.66). This group has working seniority

from 12.61 ± 9.70 years, exposed to a mix of pesticides mention previously for 6.16 ± 2.87 hours/day per 60 days consecutive every year during planting season (June-July).

Additionally, exist a weak correlation ($p = 0.044$, $r = 0.40$) between the hours of exposition and immunotoxicity biomarkers (IgE & eosinophils). Although there is a weak or null correlation between symptoms and biomarkers, more than 50% of POE group with prolonged exposition (>10 hours/day, >7 days/week, >30 year) shows dermatological and respiratory alterations; besides that, the majority of the POE group present biomarker (SOD, CAT & LIPOX) values above the arithmetic mean. It was not possible to make an association between the biomarkers of oxidative stress and immunoglobulins ($p > 0.05$, SOD $r \approx 0.128$, CAT $r \approx 0.275$ & LIPOX $r \approx 0.258$).

Table 4. Immunoglobulins results of studied population.

	REFERENCE VALUES ²³⁻²⁵	CONTROL	POE	<i>p</i> value
Ig G (mg/dL)	600-1700	1448.00 ± 215.62	1804.10 ± 530.97	0.004 †
Ig M (mg/dL)	40-230	100.03 ± 36.37	121.20 ± 88.29	0.277
Ig E (UI/mL)	≤ 350	136.16 ± 45.06	437.66 ± 397.68	0.004 †

P values were calculated by U-Mann Whitney

† Statistically significant ($p < 0.05$)

4. DISCUSSION

The toxic effect of pesticides as POPs on both animals and humans has been reported widely around the world. Longs time of exposure to pesticides are associated in humans with chronic diseases that affect neurological, endocrines and immunological systems^{11,12}. The biological factors like age, gender, nutrition, environmental factors and others, influence in the expression of pesticides negative effect. It should be highlighted that also the socioeconomic factors of the exposed population play a key role in immunotoxicity. In this study was observed a middle-low socioeconomic level predominance in POE group with a limited scholar grade (46.57% elementary school, 49.31% high school & 4.19% bachelor degree). Population with low economic resources cannot afford the necessary safety equipment and buy environmentally friendly pesticides, in this study can be observed that start buying ecofriendly pesticides but continue using POPs, as well as usually have poor knowledge of pesticides management³¹.

Furthermore, POE group reports an incomplete or null vaccination scheme despite government free health support. Avoiding the well-known artificial active immunity benefits.

Housewives represents the majority of POE group and 78.57% percentage of them are part of a family in contact with children. This situation increases the risk of exposition to indirect doses of pesticides by different transfer mechanisms to all family members. Further investigation is needed to evaluate these vulnerable groups (children) and determine whether there is any progressive damage or health alterations.

In another hand, a statistically difference in oxidative stress biomarkers (SOD, CAT) in POE group compared with control group could be attributed to pesticides exposure, which increases toxic reactive oxygen species (ROS) generation, leading to stress biomarkers alterations³². The reduction-oxidation reactions inside of erythrocytes prompted by ROS presence provokes a disruption process in the antioxidant system³³. Therefore, the ability of antioxidant defense mechanisms is surpassed, allowing damage in macromolecules (DNA, RNA, proteins) and so different ailments. Recently, Hernandez *et al*³⁴ reported similar alterations in oxidative biomarkers. Additionally, oxidative damage in the viability of circulation cells provokes an adaptative reaction of bone marrow that leads to an abnormal increment in neutrophils band concentration for POE group. The immune system alterations in enzymatic and non-enzymatic antioxidant system avoid the scavenging of the free radical and ROS making POE group more susceptible to illness, also POE overweight and obesity detected increment the risk of chronic degenerative diseases and promotes deposition of pesticides in adipose tissue³⁵.

García-García *et al.* 2016³⁶ and Lozano-Paniagua *et al.* 2018¹⁴ studied a chronically exposed populations and found changes in their clinical chemistry parameters included decreased levels of glucose, creatinine, total cholesterol, triglyceride, changes in oxidative stress and lipid peroxidation biomarkers as wells as clinical effects mainly in the skin and eyes of pesticide exposed population. In this study, also for POE group was found a higher prevalence of clinical symptoms in the upper respiratory tract (pharyngitis, rhinitis) and ocular signs (conjunctivitis) than control group³⁷. These symptoms could be incremented due to the poor safety measurements used by POE group during pesticides manipulation. However, it is important to mention that to improve the correlation of clinical symptoms with pesticides exposure it is needed to develop local longitudinal studies that take in account qualitative variables.

On the other hand, there was a significant difference in the levels of immunoglobulins G and E between POE and control group denoting alterations in the humoral immunity. Control group immunoglobulins results were between reference values in contrast to POE group which were above reference values (with a maximum of 1.37 times fold). Similar results have been reported, Castillo-Cadena *et al.*³⁸ and Mecdad *et al.*¹³, in a chronically exposed population evaluate the oxidative stress and immunomodulatory effects of pesticides exposure among agricultural, founding that chronically pesticides exposure generates significant oxidative damage, compromised antioxidant status and immunoglobulins alteration. The increment of the immunoglobulins is allied with diseases of the upper and lower respiratory tract like sinusitis, rhinopharyngitis, bronchitis, asthma, among others. Besides, immunoglobulin E alterations have been associated with the presence of allergies in POE¹². It should be noted that the pesticides more using POE group (atrazine and 2,4-D) have been related with decrease of cellular immune activity (monocyte, lymphocyte B and T) and increase of the hypersensibility (IgE and allergies), which were concordant with this research. It was observed 10 volunteers of POE group present a type of allergy and 4 out of 7.3 present clinical symptoms of some type of illness related it with allergies (Figure 2). It is a clear association between immunoglobulin E, oxidative stress alteration and negative health effect in POE chronically exposed to pesticides. Therefore, farmers exposed to pesticides could be more susceptible to chronic respiratory diseases, leading to an increment of public health services, familiar costs and a decrease in quality of life³⁹.

In addition to the health implications of exposure to pesticides, it is important to mention that pesticides should not be used in areas of flora and fauna protection due to Mexican regulations. Therefore, the present investigation acquires relevance, describing the use of pesticides in APFF of "Nevado de Toluca", alteration in health of people and the relation of this factors. It is important that rural workers and local authorities promote sustainable agriculture to avoid environmental and health negative implications in the population of the habitants near to APFF of "Nevado de Toluca".

5. CONCLUSIONS

The results of this study revealed high levels of oxidative stress, antioxidant system alterations, ailment immune functions and adverse health effects alteration in occupationally exposed

farmers to pesticides. Leaving aside that the symptoms are not specific to pesticides exposure, the alterations found in this work are consistent with multiple research on the field. To minimize exposition negative effect is necessary to training POE population to use safety measurements during pesticides manipulation. It is strongly recommended to the general population, especially farmers, to be aware of biological risk of interacts with pesticides. Rural workers and local authorities must promote sustainable agriculture to avoid environmental and health negative implications in the APFF of “Nevado de Toluca”.

6. REFERENCES

1. FAO. *Código Internacional de Conducta Para La Distribución y Utilización de Plaguicidas*. Roma; 2016. doi:92-5-30-5411-5
2. European Environment Agency. agricultural pollution. <https://www.eea.europa.eu/help/glossary/semide-emwis-thesaurus/agricultural-pollution>. Published 2017.
3. Kim K-H, Kabir E, Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ*. 2017;575:525-535. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2016.09.009
4. Wang X, Martínez MA, Dai M, et al. Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. *Environ Res*. 2016;149:86-104. doi:10.1016/j.envres.2016.05.003
5. Noshay MM, Saad-Hussein A, Shahy EM, El-Shorbagy HM, Taha MM, Abdel-Shafy EA. Assessment of Anticholinesterase Toxicity, Oxidative Stress and Antioxidant Status in Carbamate and Organophosphorus Pesticides Exposed Agricultural Workers. *Int J Pharm Clin Res*. 2017;9(3):205-209. doi:10.25258/ijpcr.v9i3.8319
6. Jayaraj R, Megha P, Sreedev P. Review Article. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip Toxicol*. 2016;9(3-4):90-100. doi:10.1515/intox-2016-0012
7. Jaramillo BE, Martelo I, Duarte E. Acute toxicity of organophosphorus pesticides and analysis of quantitative structure - activity relationship (Qsar). *Biotechnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial*. 2013;11(2):76-84.
8. Del Puerto A, Suárez S, Palacio D. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 2014;52(3):372-387. <http://scielo.sld.cu>.
9. Saadi HS, Abdollahi M. The Importance of Pesticides Effects on Human Reproduction in Farmers. *Int J Pharmacol*. 2012;8(6):467-469. doi:10.3923/ijp.2012.467.469

10. Mostafalou S, Abdollahi M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;268(2):157-177. doi:10.1016/j.taap.2013.01.025
11. Mwanga HH, Dalvie MA, Singh TS, Channa K, Jeebhay MF. Relationship between pesticide metabolites, cytokine patterns, and asthma-related outcomes in rural women workers. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(10). doi:10.3390/ijerph13100957
12. Aroonvilairat S, Kespichayawattana W, Sornprachum T, Chaisuriya P, Siwadune T, Ratanabanangkoon K. Effect of Pesticide Exposure on Immunological, Hematological and Biochemical Parameters in Thai Orchid Farmers— A Cross-Sectional Study. *Int J Environ Res Public Heal Int J Environ Res Public Heal.* 2015;12:5846-5861. doi:10.3390/ijerph120605846
13. Mecdad AA, Ahmed MH, ElHalwagy MEA, Afify MMM. A study on oxidative stress biomarkers and immunomodulatory effects of pesticides in pesticide-sprayers. *Egypt J Forensic Sci.* 2011;1(2):93-98. doi:10.1016/j.ejfs.2011.04.012
14. Lozano-Paniagua D, Parrón T, Alarcón R, et al. Biomarkers of oxidative stress in blood of workers exposed to non-cholinesterase inhibiting pesticides. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018;162(June):121-128. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.06.074
15. Costa C, Gangemi S, Giambo F, Rapisarda V, Caccamo D, Fenga C. Oxidative stress biomarkers and paraoxonase 1 polymorphism frequency in farmers occupationally exposed to pesticides. *Mol Med Rep.* 2015;12(4):6353-6357. doi:10.3892/mmr.2015.4196
16. CONANP. Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca. SEMARNAT. <http://nevadodetoluca.conanp.gob.mx/index.php>. Published 2017. Accessed June 7, 2017.
17. Delgado MC, Amaya A, Sánchez JC. Modelaje del transporte y destino de los Plaguicidas Orgánicos Persistentes identificados en el cultivo de la papa en Calimaya, Estado de México (tesis de maestría). *UAEM.* 2016.
18. WHO. Alcohol. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/alcohol>. Published 2018. Accessed November 24, 2018.
19. WHO. *The Global Tobacco Epidemic*; 2015. www.who.int/tobacco. Accessed November 24, 2018.
20. Radi R, Turrensll JF, Yi Changll L, Bush KM, Crapoll JD, Freeman BA. Detection of Catalase in Rat Heart Mitochondria*. *J Biol Chemistry.* 1991;266(32):22028-22034.

- <http://www.jbc.org/content/266/32/22028.full.pdf>. Accessed October 2, 2017.
21. Misra HP, Fridovich I. The Role of Superoxide Anion in the Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247(10):3170-3175.
 22. Büege JA, Steven DA. Microsomal lipid peroxidation. 1978;52:302-310. doi:10.1016/S0076-6879(78)52032-6
 23. Spinreact. *Quantitative Determination of Immunoglobulin E (IgE)*.; 2011. http://www.spinreact.com/files/Inserts/SERIE_SPINLAB_180/Turbilatex/IgE-02-2011.pdf. Accessed November 24, 2018.
 24. Spinreact. *Quantitative Determination of Immunoglobulin G (IgG)*.; 2011.
 25. Spinreact. *Quantitative Determination of Immunoglobulin M (IgM)*.; 2011.
 26. Asociación Mexicana de Agencias de Inteligencia de Mercado y Opinión. Niveles Socio Económicos AMAI. <http://nse.amai.org/niveles-socio-economicos/>. Accessed February 28, 2019.
 27. WHO. 10 datos sobre la obesidad. <https://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/>. Accessed February 28, 2019.
 28. Kliegman RM, Stanton BMD, St. Geme J. *Tratado de Pediatría*. Elsevier; 2016.
 29. INEGI. *Prontuario de Información Geográfica Municipal de Los Estados Unidos Mexicanos Calimaya, México*. México; 2009. <http://mapserver.inegi.org.mx/mgn2k/>; Accessed January 18, 2019.
 30. Monroy R, Mellado Y, Flores G, Vargas P. Artículo de revisión Semiología de la citometría hemática. *UNAM*. 2010;53:5-11.
 31. Rahman S. Agroecological, climatic, land elevation and socio-economic determinants of pesticide use at the farm level in Bangladesh. *Agric Ecosyst Environ*. 2015;212:187-197. doi:10.1016/j.agee.2015.07.002
 32. Kaur R. Diseases caused by pesticide induce oxidative stress – A Review. 2018;(August).
 33. Kaur RP, Gupta V, Christopher AF, Bansal P. Potential pathways of pesticide action on erectile function – A contributory factor in male infertility. *Asian Pacific J Reprod*. 2015;4(4):322-330. doi:10.1016/j.apjr.2015.07.012
 34. Hernández AF, Lacasaña M, Gil F, Rodríguez-Barranco M, Pla A, López-Guarnido O. Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene-environment interaction perspective. *Toxicology*. 2013;307:95-102. doi:10.1016/j.tox.2012.09.007
 35. Genuis SJ, Lane K, Birkholz D. Human Elimination of Organochlorine Pesticides:

-
- Blood, Urine, and Sweat Study. *Biomed Res Int*. 2016;2016(i):1-10. doi:10.1155/2016/1624643
36. García-García CR, Parrón T, Requena M, Alarcón R, Tsatsakis AM, Hernández AF. Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. *Life Sci*. 2016;145:274-283. doi:10.1016/j.lfs.2015.10.013
 37. Burns CJ, Pastoor TP. Pyrethroid epidemiology: a quality-based review. *Crit Rev Toxicol*. 2018;48(4):297-311. doi:10.1080/10408444.2017.1423463
 38. Castillo-Cadena J, González-Mercado AL, Hernández-Caballero N, Juan ERS, Álvarez-González I, Madrigal-Bujaidar E. Immunotoxic damage in floriculturists exposed to pesticide mixtures. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes*. 2013;48(1):33-39. doi:10.1080/03601234.2012.716690
 39. Carvalho FP. Pesticides, environment, and food safety. *Food Energy Secur*. 2017;6(2):48-60. doi:10.1002/fes3.108

7. Referencias bibliográficas

- Abhijith, B. D., Ramesh, M., & Poopal, R. K. (2016). Responses of metabolic and antioxidant enzymatic activities in gill, liver and plasma of *Catla catla* during methyl parathion exposure. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 77, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.11.002>
- AGC. (2012). Servicio de Inmunología: Biblioteca de Pruebas.
- Aguilar-Barojas, S. (2005). Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud En Tabasco*, 11(1–2), 333–338. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48711206>
- Alatorre, R. del C., Gallaga, J. C., Conde, P. del C., & Rosales, J. A. (2016). *Catálogo de plaguicidas. Catálogo de Plaguicidas*. México, DF.
- Aroonvilairat, S., Kespichayawattana, W., Sornprachum, T., Chaisuriya, P., Siwadune, T., & Ratanabanangkoon, K. (2015). Effect of Pesticide Exposure on Immunological, Hematological and Biochemical Parameters in Thai Orchid Farmers— A Cross-Sectional Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 5846–5861. <https://doi.org/10.3390/ijerph120605846>
- Bakırcı, G. T., Yaman Acay, D. B., Bakırcı, F., & Ötleş, S. (2014). Pesticide residues in fruits and vegetables from the Aegean region, Turkey. *Food Chemistry*, 160, 379–392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.051>
- Bar-Or, D., Bar-Or, R., Rael, L. T., & Brody, E. N. (2015). Oxidative stress in severe acute illness. *Redox Biology*, 4, 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.006>
- Bini Dhouib, I., Annabi, A., Jallouli, M., Marzouki, S., Gharbi, N., Elfazaa, S., & Lasram, M. M. (2016a). Carbamates pesticides induced immunotoxicity and carcinogenicity in human: A review. *Journal of Applied Biomedicine*, 14(2), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2016.01.001>
- Bini Dhouib, I., Annabi, A., Jallouli, M., Marzouki, S., Gharbi, N., Elfazaa, S., & Lasram, M. M. (2016b). Carbamates pesticides induced immunotoxicity and carcinogenicity in human: A

-
- review. *Journal of Applied Biomedicine*, 14(2), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2016.01.001>
- Bray, G. A., Kim, K. K., & Wilding, J. P. H. (2017). Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obesity Reviews*, 18(7), 715–723. <https://doi.org/10.1111/obr.12551>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52(C), 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Burns, C. J., & Pastoor, T. P. (2018). Pyrethroid epidemiology: a quality-based review. *Critical Reviews in Toxicology*, 48(4), 297–311. <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1423463>
- Canbaz, D., Logiantara, A., van Ree, R., & van Rijt, L. S. (2017). Immunotoxicity of organophosphate flame retardants TPHP and TDCIPP on murine dendritic cells in vitro. *Chemosphere*, 177, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.149>
- Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48–60. <https://doi.org/10.1002/fes3.108>
- Castillo-Cadena, J., González-Mercado, A. L., Hernández-Caballero, N., Juan, E. R. S., Álvarez-González, I., & Madrigal-Bujaidar, E. (2013). Immunotoxic damage in floriculturists exposed to pesticide mixtures. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 48(1), 33–39. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.716690>
- Cattelan, M. D. P., Maurer, P., Garcia, F., Berro, L. F., Machado, M. M., Manfredini, V., & Piccoli, J. da C. E. (2018). Occupational exposure to pesticides in family agriculture and the oxidative, biochemical and hematological profile in this agricultural model. *Life Sciences*, 203, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.038>
- Corrales, L. C., & Muñoz, M. (2012). Estrés oxidativo : origen , evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova - Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 10(18), 132–250.
- Corsini, E., Sokooti, M., Galli, C. L., Moretto, A., & Colosio, C. (2013a). Pesticide induced

- immunotoxicity in humans: A comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology*, 307, 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.10.009>
- Corsini, E., Sokooti, M., Galli, C. L., Moretto, A., & Colosio, C. (2013b). Pesticide induced immunotoxicity in humans: A comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology*, 307, 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.10.009>
- Corsini, Emanuela, Oukka, M., Pieters, R., Kerkvliet, N. I., Ponce, R., & Germolec, D. R. (2011). Alterations in regulatory T-cells: Rediscovered pathways in immunotoxicology. *Journal of Immunotoxicology*. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2011.598885>
- Costa, C., Gangemi, S., Giambo, F., Rapisarda, V., Caccamo, D., & Fenga, C. (2015). Oxidative stress biomarkers and paraoxonase 1 polymorphism frequency in farmers occupationally exposed to pesticides. *Molecular Medicine Reports*, 12(4), 6353–6357. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4196>
- Costa, C., Rapisarda, V., Catania, S., Di Nola, C., Ledda, C., & Fenga, C. (2013). Cytokine patterns in greenhouse workers occupationally exposed to α -cypermethrin: An observational study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), 796–800. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2013.07.004>
- Degrossi, C. (2013). *Conceptos Básicos de Toxicología Toxicocinética*. Buenos Aires: Belgrano.
- Del Puerto, A., Suárez, S., & Palacio, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372–387. Retrieved from <http://scielo.sld.cu>
- Delgado, M. C., Amaya, A., & Sánchez, J. C. (2016). *Modelaje del transporte y destino de los Plaguicidas Orgánicos Persistentes identificados en el cultivo de la papa en Calimaya, Estado de México (Tesis de maestría)*. UAEM. Universidad Autónoma del Estado de México. Retrieved from <http://ri.uaemex.mx/>
- Dhouib, I., Jallouli, M., Annabi, A., Marzouki, S., Gharbi, N., Elfazaa, S., & Lasram, M. M. (2016). From immunotoxicity to carcinogenicity: the effects of carbamate pesticides on the immune system. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10), 9448–9458. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6418-6>

- Di Leo, N., Bonel, B., & Montico, S. (2015). *Estrategias para la racionalización del uso y manejo de fitosanitarios en espacios periurbanos*. (Vol. 1). Buenos Aires.
- Diario Oficial de la Federación. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (2005). México. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Dreyer, A., Arancibia, M., Arnao, M. R., Cavieres, M. F., & López, P. del R. (2016). Exposición a plaguicidas y determinantes sociales de la salud en pequeños agricultores y agricultoras de la V Región. *Revista Cuestiones de Población y Sociedad*, 7(7), 21–31.
- Ezequiel, P., Miguel, G., Gustavo, H. M., & Nora, M. (2015). Toxicology of Organochlorines: Implications of Presence in Breast Milk. *Journal of Applied Life Sciences International*, 2(2), 49–64. <https://doi.org/10.9734/JALSI/2015/13444>
- FAO. (2016). *Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas*. Roma. <https://doi.org/92-5-30-5411-5>
- Fernández, D. G., Mancipe, L. C., & Fernández, D. C. (2010). Intoxicación Por Organofosforados. *Revista Med*, 18(1), 84–92.
- Francisco, V., Pino, J., Campos-Cabaleiro, V., Ruiz-Fernández, C., Mera, A., Gonzalez-Gay, M. A., ... Gualillo, O. (2018). Obesity, fat mass and immune system: Role for leptin. *Frontiers in Physiology*, 9(JUN), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00640>
- Fukuyama, T., Tajima, Y., Ueda, H., Hayashi, K., & Kosaka, T. (2012). Prior exposure to immunosuppressive organophosphorus or organochlorine compounds aggravates the TH1- and TH2-type allergy caused by topical sensitization to 2,4-dinitrochlorobenzene and trimellitic anhydride. *Journal of Immunotoxicology*, 8(2), 170–182. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2011.566231>
- Gangemi, S., Gofita, E., Costa, C., Teodoro, M., Briguglio, G., Nikitovic, D., ... Fenga, C. (2016). Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 38(4), 1012–1020. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2728>

- García-García, C. R., Parrón, T., Requena, M., Alarcón, R., Tsatsakis, A. M., & Hernández, A. F. (2016). Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. *Life Sciences*, 145, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.013>
- García, C., & Rodríguez, G. (2012). Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, 8, 1–10.
- Genuis, S. J., Lane, K., & Birkholz, D. (2016). Human Elimination of Organochlorine Pesticides: Blood, Urine, and Sweat Study. *BioMed Research International*, 2016(i), 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/1624643>
- Gobierno de Calimaya/IGCEM. (2016). *Plan de Desarrollo Municipal de Calimaya 2016-2018. Gobierno del Estado de México* (Vol. 1). Calimaya.
- Hernández, A. F., Lacasaña, M., Gil, F., Rodríguez-Barranco, M., Pla, A., & López-Guarnido, O. (2013). Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene-environment interaction perspective. *Toxicology*, 307, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.007>
- Hilgert Jacobsen-Pereira, C., Dos Santos, C. R., Troina Maraslis, F., Pimentel, L., Feijó, A. J. L., Iomara Silva, C., ... Weidner Maluf, S. (2018). Markers of genotoxicity and oxidative stress in farmers exposed to pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.004>
- Hoppin, J. A., Umbach, D. M., London, S. J., Henneberger, P. K., Kullman, G. J., Alavanja, M. C. R., & Sandler, D. P. (2008). Pesticides and atopic and nonatopic asthma among farm women in the agricultural health study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177(1), 11–18. <https://doi.org/10.1164/rccm.200706-821OC>
- Hossain, M. S., & Sikder, M. T. (2015). Potential Human Health Impacts and Medical Treatment of Acute Poisoning with Organophosphorus Pesticides (OPs): A Review. *Science Publishing Group*, 3(2), 6. <https://doi.org/10.11648/j.ijepp.s.2015030201.12>
- INEGI. (2009). *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Calimaya, México*. México. Retrieved from <http://mapserver.inegi.org.mx/mgn2k/>;

- Jaramillo, B. E., Martelo, I., & Duarte, E. (2013). Acute toxicity of organophosphorus pesticides and analysis of quantitative structure - activity relationship (Qsar). *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2), 76–84.
- Javed, M., Zeeshan, M., Assistant, M., Khaliq, A., Arshad, M., Bakar, M. A., & Majeed, M. Z. (2015). Review on exposure, absorption and elimination of pyrethroids in humans. *Journal of Entomology and Zoology Studies JEZS*, 180(35), 180–184. Retrieved from <http://www.entomoljournal.com/vol3Issue5/pdf/3-4-60.1.pdf>
- Jayaraj, R., Megha, P., & Sreedev, P. (2016). Review Article. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary Toxicology*, 9(3–4), 90–100. <https://doi.org/10.1515/intox-2016-0012>
- Kaur, R. (2018). Diseases caused by pesticide induce oxidative stress – A Review, (August).
- Kaur, R. P., Gupta, V., Christopher, A. F., & Bansal, P. (2015). Potential pathways of pesticide action on erectile function – A contributory factor in male infertility. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(4), 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2015.07.012>
- Kim, K.-H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of The Total Environment*, 575, 525–535. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.09.009>
- Kliegman, R. M., Stanton, B. M. D., & St. Geme, J. (2016). Capítulo 1 Aspectos generales de la pediatría. In *Tratado de pediatría* (p. 5036). Elsevier.
- Kumar, J., Lind, L., Salihovic, S., van Bavel, B., Ingelsson, E., & Lind, P. M. (2014). Persistent organic pollutants and liver dysfunction biomarkers in a population-based human sample of men and women. *Environmental Research*, 134, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.07.023>
- Lee, D. H., Lind, P. M., Jacobs, D. R., Salihovic, S., van Bavel, B., & Lind, L. (2016). Association between background exposure to organochlorine pesticides and the risk of cognitive impairment: A prospective study that accounts for weight change. *Environment International*, 89–90. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.001>

- Leerro, C. C., Beane Freeman, L. E., Portengen, L., Kang, D., Lee, K., Blair, A., ... Vermeulen, R. C. H. (2017). A longitudinal study of atrazine and 2,4-D exposure and oxidative stress markers among iowa corn farmers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(1), 30–38. <https://doi.org/10.1002/em.22069>
- Madani, F. Z., Hafida, M., Merzouk, S. A., Loukidi, B., Taouli, K., & Narce, M. (2016). Hemostatic, inflammatory, and oxidative markers in pesticide user farmers. *Biomarkers*, 21(2), 138–145. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2015.1118545>
- Magnarelli, G. (2015a). Exposición ambiental a plaguicidas: biomarcadores en matrices de la tríada madre-placenta-feto. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 49(1), 39–53. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v49n1/v49n1a07.pdf%0Ahttp://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572015000100007&lang=pt
- Magnarelli, G. (2015b). Exposición ambiental a plaguicidas: biomarcadores en matrices de la tríada madre-placenta-feto. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 49(1), 39–53. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572015000100007&lang=pt
- Mamane, A., Baldi, I., Tessier, J.-F., Raherison, C., & Bouvier, G. (2015). Occupational exposure to pesticides and respiratory health. *European Respiratory Review*, 24, 306–319. <https://doi.org/10.1183/16000617.00006014>
- Martínez-Valenzuela, C., & Gómez-Arroyo, S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 23(4), 185–200. Retrieved from <http://scielo.unam.mx/pdf/rica/v23n4/v23n4a4.pdf>
- Mecdad, A. A., Ahmed, M. H., ElHalwagy, M. E. A., & Afify, M. M. M. (2011). A study on oxidative stress biomarkers and immunomodulatory effects of pesticides in pesticide-sprayers. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 1(2), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2011.04.012>
- Minghelli, B., Oliveira, R., & Nunes, C. (2015). Association of obesity with chronic disease and musculoskeletal factors. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, 61(4), 347–354.

- <https://doi.org/10.1590/1806-9282.61.04.347>
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The Role of Superoxide Anion in the Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170–3175.
- Mitra, A., Sarkar, M., & Chatterjee, C. (2017). Modulation of Immune Response by Organophosphate Pesticides: Mammals as Potential Model. *Proceedings of the Zoological Society*, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12595-017-0256-5>
- Mokarizadeh, A., Faryabi, M. R., Rezvanfar, M. A., & Abdollahi, M. (2015). A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: Mechanisms, evidence and consequences. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 25(4), 258–278. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1020182>
- Monroy, R., Mellado, Y., Flores, G., & Vargas, P. (2010). Artículo de revisión Semiología de la citometría hemática. *UNAM*, 53, 5–11.
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2), 157–177. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025>
- Muñoz-Quezada, M. T., Lucero, B., Iglesias, V., Muñoz, M. P., Achú, E., Cornejo, C., ... Brito, A. M. (2016). Plaguicidas organofosforados y efecto neuropsicológico y motor en la Región del Maule, Chile. *Gaceta Sanitaria*, 30(3), 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2016.01.006>
- Mwanga, H. H., Dalvie, M. A., Singh, T. S., Channa, K., & Jeebhay, M. F. (2016). Relationship between pesticide metabolites, cytokine patterns, and asthma-related outcomes in rural women workers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/ijerph13100957>
- Ojha, A., Yaduvanshi, S., & Srivastava, N. (2011). Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticides on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(2), 148–156. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2010.11.011>

- Olatunbosun, A., Surajudeen, Y., Sheu, R., & Ayokulehin, K. (2014). Oxidative stress indices in Nigerian pesticide applicators and farmers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 4(3), 37. <https://doi.org/10.4103/2229-516X.140730>
- OPS/OMS. (2002). La salud en las Américas. *PAHO*, 1(587), 473.
- Ortega Freyre, E. G., Carrera Gracia, M. A., Delgadillo Guzmán, D., Intriago Ortega, M. P., Lares Bayona, E. F., & Quintanar Escorza, M. A. (2016). Asociación de la exposición ocupacional a plaguicidas organofosforados con el daño oxidativo y actividad de acetilcolinesterasa. *Revista de Toxicología*, 33(1), 39–43. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/919/91946517006.pdf>
- Oulhote, Y., Shamim, Z., Kielsen, K., Weihe, P., Grandjean, P., Ryder, L. P., & Heilmann, C. (2017). Children's white blood cell counts in relation to developmental exposures to methylmercury and persistent organic pollutants. *Reproductive Toxicology*, 68, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.08.001>
- Pérez-Herrera, N., Vera-Avilés, M., Castillo-Burguete, T., Perera-Rios, J., Esperón-Hernández, R., Rojas-García, A. E., ... Quintanilla-Vega, B. (2018). Pesticide exposure index: Practices among women from an agricultural community in southeast Mexico. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 34, 57–68. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.ESP02.05>
- Pérez-Zamora, I., Shejet, O., & López-Portillo, A. (2016). Alteraciones cognitivas por exposición a disolventes industriales en trabajadores mexicanos. *Archivos En Medicina Familiar*, 18(2), 31–40. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/medfam/amf-2016/amf162b.pdf>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Quijano, A., Portilla, M., & Quijano, M. J. (2016). Identificación de carbamatos en el cultivo de durazno : suelo y fruto producido en Pamplona , Colombia. *Agronomía Colombiana*, 34(1),

- 746–750. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58719>
- Radi, R., Turrensll, J. F., Yi Changll, L., Bush, K. M., Crapoll, J. D., & Freeman, B. A. (1991). Detection of Catalase in Rat Heart Mitochondria*. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 22028–22034. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/266/32/22028.full.pdf>
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Rahman, S. (2015). Agroecological, climatic, land elevation and socio-economic determinants of pesticide use at the farm level in Bangladesh. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 212, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.07.002>
- Rahman, S., & Chima, C. D. (2018). Determinants of pesticide use in food crop production in Southeastern Nigeria. *Agriculture (Switzerland)*, 8(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/agriculture8030035>
- Ramírez, J. A., & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: Clasificación, Uso, Toxicología Y Medición De La Exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 4(2), 67–75. Retrieved from <http://www.scsmt.cat/Upload/TextCompleto/2/1/216.pdf>
- Robert, R. L., Vincent, H., Perrine, H., & Dominique, L. (2007). *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles [texte imprimé]*. Issy-les-Moulineaux. Elsevier Masson. Retrieved from <https://www.elsevier-masson.fr/toxicologie-industrielle-et-intoxications-professionnelles-9782294014185.html>
- Saadi, H. S., & Abdollahi, M. (2012). The Importance of Pesticides Effects on Human Reproduction in Farmers. *International Journal of Pharmacology*, 8(6), 467–469. <https://doi.org/10.3923/ijp.2012.467.469>
- Schaalan, M., Abdelraouf, S. M., Mohamed, W. A., & Hassanein, F. S. (2017). Correlation between maternal milk and infant serum levels of chlorinated pesticides (CP) and the impact of elevated CP on bleeding tendency and immune status in some infants in Egypt. *Journal of Immunotoxicology*, 9(1), 15–24. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2011.606432>

- Shapiro, G. D., Dodds, L., Arbuckle, T. E., Ashley-Martin, J., Ettinger, A. S., Fisher, M., ... Fraser, W. (2016). Exposure to organophosphorus and organochlorine pesticides, perfluoroalkyl substances, and polychlorinated biphenyls in pregnancy and the association with impaired glucose tolerance and gestational diabetes mellitus: The MIREC Study. *Environmental Research*, 147, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.040>
- Silbergeld, E. (1998). *Toxicología, principios generales de la toxicología*. (Chantal Dufresne, Ed.) (1a ed.). España: Enciclopedia de Salud y Seguridad En El Trabajo. Retrieved from <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo1/33.pdf>
- Simoniello, M. F., Kleinsorge, E. C., Scagnetti, J. A., Mastandrea, C., Grigolato, R. A., Paonessa, A. M., & Carballo, M. A. (2010). Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population. *Biomarkers*, 15(1), 52–60. <https://doi.org/10.3109/13547500903276378>
- Spinreact. (2011a). *Quantitative determination of immunoglobulin E (IgE)*. Retrieved from http://www.spinreact.com/files/Inserts/SERIE_SPINLAB_180/Turbilatex/IgE-02-2011.pdf
- Spinreact. (2011b). *Quantitative determination of immunoglobulin G (IgG)*.
- Spinreact. (2011c). *Quantitative determination of immunoglobulin M (IgM)*.
- Steven, G. (2012). *A small dose of toxicology*. (Healthy Worl Press, Ed.), *Healthy Word Press* (Segunda). Unites States. <https://doi.org/10.4324/9780203461730>
- Stockholm Convention. (2017). The New POPs- Stockholm Convention. Retrieved October 2, 2017, from <http://www.pops.int/>
- Suarez-Lopez, J. R., Himes, J. H., Jacobs, D. R., Alexander, B. H., & Gunnar, M. R. (2013). Acetylcholinesterase Activity and Neurodevelopment in Boys and Girls. *PEDIATRICS*, 132(6), e1649–e1658. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-0108>
- Tecuapetla, M. G., Amaya, A., & Sánchez, J. C. (2014). *Ecotoxicidad producida por agroquímicos empleados en el cultivo de Gerbera jamesonii en invernadero, en Villa Guerrero, Estado de México (tesis de maestría)*. Universidad Autónoma del Estado de

- México.
- U.S. Department of health and human services. (2003). Toxicological profile for malathion. *ATSDR*, 1–323. Retrieved from <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp154.pdf>
- U.S. Department of Health and Human Services. (2017). ATSDR - Toxprofile: Toxicological Profile Information Sheet. Retrieved September 30, 2017, from <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/index.asp>
- Ündeğer, U., & Başaran, N. (2001). Effects of pesticide exposure on serum immunoglobulin and complement levels. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 23(3), 437–443. <https://doi.org/10.1081/IPH-100107342>
- University of Herfordshire. (2017). BPDB:Bio-Pesticides DataBase. Retrieved September 29, 2017, from <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/bpdb/atoz.htm>
- Waliszewski, S. M., Caba, M., Gómez, S., Meza, E., Villalobos, R., Marítnez, C., & Valencia, A. (2015). Niveles de plaguicidas organoclorados en suero sanguíneo comparados con la concentración de lípidos sanguíneos. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 31(2), 155–164.
- WHO. (2016). Prevención y gestión de las intoxicaciones. Retrieved June 7, 2017, from <http://www.who.int/ipcs/poisons/es/>
- World Health Organization (WHO). (2011). *The global tobacco epidemic, 2011. WHO* (Vol. 20). Retrieved from http://www.who.int/tobacco/global_report/2011/en/
- World Health Organization (WHO). (2018). Alcohol. Retrieved November 24, 2018, from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/alcohol>
- World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. (2010). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009. *Geneva: World Health Organization*, 78. Retrieved from <http://www.who.int/iris/handle/10665/44271>
- Zhang, C., Qin, L., Dou, D. C., Li, X. N., Ge, J., & Li, J. L. (2018). Atrazine induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in quail (*Coturnix C. coturnix*) kidney via modulating

Nrf2 signaling pathway. *Chemosphere*, 212, 974–982.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.138>

Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., ... Zhang, C. Y. (2010). Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Molecular Cell*, 39(1), 133–144.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.010>

ANEXO A. Carta de consentimiento informado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
FACULTAD DE QUÍMICA-MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Carta de Consentimiento Informado para Participar en Proyectos de Investigación derivados de la UAEMéx

“Inmunotoxicidad y estrés oxidativo en agricultores expuestos crónicamente a plaguicidas en Calimaya, Estado de México”.

Lugar de realización del estudio:

FACULTAD DE QUÍMICA, UAEM

Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan, colonia Residencial Colón C.P. 50120

Toluca, Estado de México.

Teléfonos: (722) 2175109/ 2173890

Descripción del estudio

Actualmente el sector agrícola se ve en la necesidad de emplear agroquímicos que permitan una mayor producción y rendimiento de los cultivos; dentro de este grupo se encuentran los plaguicidas, compuestos que puede producir efectos negativos en la población.

Calimaya se encuentra entre los primeros tres municipios aledaños a la Zona del Nevado de Toluca, por su alta producción agrícola en maíz, avena forrajera y papa, ocupan distintos tipos de plaguicidas para mejorar los cultivos. La exposición crónica a plaguicidas en los agricultores de Calimaya, Estado de México, puede aumentar el riesgo de efectos nocivos a la salud.

Actualmente se busca evaluar a la población que ese encuentra expuesta a plaguicidas en este municipio, para lo cual se aplicará un cuestionario y tomará una muestra de sangre venosa para medir el estado de salud con pruebas que se llevan a cabo en el laboratorio. No se le administrará ningún medicamento.

Propósito del estudio:

- Evaluar el estado de salud de los agricultores con un panel muy específico de pruebas

Procedimientos:

- 1. Estudios de Laboratorio.** Para poder realizarle los estudios de laboratorio deberá presentarse en ayuno de 12 horas. Tomaremos una muestra de 11 mililitros de su sangre (3 tubos) para realizarle algunos estudios de laboratorio. Nos tardaremos aproximadamente 10 minutos en tomarle la muestra y 15 minutos en aplicación de cuestionario.
- 2. Estudios de Gabinete.** Se le tomará la presión sanguínea, pulso, saturación de oxígeno, temperatura, frecuencia respiratoria, peso y talla.

PrUEBAS DE EVALUACIÓN:

Biometría Hemática	<input type="checkbox"/> Hemograma <input type="checkbox"/> Eritrocitos <input type="checkbox"/> Leucocitos <input type="checkbox"/> Hematocrito <input type="checkbox"/> Hemoglobina <input type="checkbox"/> Plaquetas <input type="checkbox"/> Hemoglobina
--------------------	---

Estrés Oxidativo (Enzimas que participan en la reducción del estrés oxidativo)	<input type="checkbox"/> Superóxido dismutasa (SOD) <input type="checkbox"/> Catalasa (CAT) <input type="checkbox"/> Lipoperoxidación
--	---

Posibles Riesgos y Molestias:

Las molestias o riesgos asociados con los estudios de laboratorio son mínimos. En algunas ocasiones el procedimiento para tomarle una muestra de sangre puede causar un mínimo dolor o una discreta molestia.

Beneficios anticipados para los participantes:

El principal beneficio de su participación en este estudio de investigación es que tendrá una mejor idea sobre su estado de salud en general. Si su condición clínica requiere de atención, se le sugerirá asistir a consulta médica con su médico familiar. .

Alternativas de Participación:

Su participación en este estudio es completamente voluntaria y en el momento que decida abandonarlo, siéntase con la libertad de hacerlo.

PAGO POR SU PARTICIPACIÓN:

No recibirá un pago por su participación en este estudio. A cambio se le realizaron una serie de estudios de gabinete y de laboratorio, de manera gratuita.

OBLIGACIÓN FINANCIERA

No tendrá que pagar por participar en este estudio de investigación, ni tampoco recibirá ningún pago de cualquier especie.

Privacidad y Confidencialidad:

La información que se obtenga como parte de este estudio es estrictamente confidencial. Los datos personales que nos proporcione, sus cuestionarios, y sus resultados serán guardados en un archivero bajo llave en las oficinas de la Facultad de Química. Sólo el equipo de esta investigación tendrá acceso a su información.

PARTICIPACIÓN Y RETIRO

Usted no tiene que participar obligatoriamente en este estudio, su participación es completamente VOLUNTARIA. Si usted decide no participar, eso no afectará su relación con la UAEMéx y tampoco afectará su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe en el ISEM. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. Usted puede hacer las preguntas que desee al inicio y a lo largo del estudio a las personas responsables.

Usted tiene la opción de dejar de participar en este estudio en cualquier momento, sin consecuencia alguna.

RESULTADOS NUEVOS:

Durante el transcurso de este estudio, le informaremos de cualquier hallazgo nuevo (ya sea bueno o malo) que sea significativo, por ejemplo, si hubiera cambios en los riesgos o beneficios por su participación en esta investigación o si hubiera nuevas alternativas que pudieran cambiar su opinión sobre su participación en este estudio. Para lo cual estaremos en contacto permanente. Los resultados globales del estudio serán publicados en una revista científica.

IDENTIDAD DE LOS INVESTIGADORES:

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse con las siguientes personas:

Investigadores Responsables:

Dra. Araceli Amaya Chávez

Profesor de Tiempo Completo

Facultad de Química, UAEMéx

Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan, colonia Residencial Colón C.P. 50120

Toluca, Estado de México.

Teléfonos: (722) 2175109/ 2173890 Ext. 115 y 120

Correo electrónico: aamayac@uaemex.mx

Qué Significa su Firma en esta Forma de Consentimiento:

Su firma significa que usted entiende la información que le proporcionamos en esta forma de consentimiento acerca del estudio. Si usted firma, significa que usted está de acuerdo en participar en el estudio.

He leído la información proporcionada anteriormente. Me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Me han dado una copia de este formato.

AL FIRMAR ESTE FORMATO, ESTOY DE ACUERDO EN PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN QUE AQUÍ SE DESCRIBE.

Nombre del Participante

Firma del Participante

Fecha

FIRMA DEL INVESTIGADOR

Le he explicado el estudio de investigación al participante, y he contestado todas sus preguntas. Creo que el/ella entiende la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre y firma del Investigador

Nombre y Firma del Testigo

ANEXO B. Historia clínico-laboral

Folio ____

Fecha: __/__/2018

Anexo C. Historia Clínica Exposición a Plaguicidas

Ficha de Identificación

Nombre: _____ Edad: _____ años

Sexo: M ☐ F ☐ Municipio de procedencia: Calimaya ☐ Otro _____Escolaridad: Analfabeto(a) ☐ Primaria ☐ Secundaria ☐ Técnico ☐ Otro ☐ _____Estado civil: Soltero(a) ☐ Casado(a) ☐

Historia laboral

Ocupación Actual: Estudiante ☐ Empleado ☐ Obrero ☐ Ama de Casa ☐ Otro: _____Trabajo en Campo: Mezclador ☐ Labrador ☐ Agricultor ☐ Fumigador ☐ Otro: _____Contrato: Fijo ☐ Temporal ☐ Tiempo de exposición laboral a plaguicidas: _____ horas/día _____ días/semanaAños laborales: _____ Continuos ☐ Intermitentes ☐ Período de descanso _____La preparación del plaguicida se realiza al aire libre ☐ espacio cerrado ☐ Fecha de la última aplicación: __/__/____Medidas de protección (marcar con ☒ equipo de protección ocupado en cada tarea realizada) :

Tarea	MEZCLA/CARGA	Equipos de protección recomendados en cada tarea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tarea		Equipos de protección recomendados en cada tarea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tarea	Aplicación por tractor 	Equipos de protección recomendados en cada tarea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tarea	Aplicación manual 	Equipos de protección recomendados en cada tarea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tarea	LIMPIEZA 	Equipos de protección recomendados en cada tarea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Cuenta con información de uso y protección de los plaguicidas: Si ☐ De quién _____ No ☐

◆ Empleo de plaguicidas ◆

Plaguicida (nombre comercial)	Uso (✓ o X)	Cantidad (kg/ha)	Frecuencia (días/semana)
Acilanina (Benalaxyl M)			
Bifentrina (Baygon Genius)			
Cipermetrina (Agrociper)			
Cys Cyflutrin (Baytroid)			
Clorotalonil (Talonil)			
Clorpirifos etil (Kañon-plus)			
Diazinon (Diazol)			
Endosulfan (Thiodan)			
Fipronil (Maxforce)			
Fluopicolide (Fluopicolid)			
Flutolanil (Moncut)			
Penfufen (Penfufen)			
Permetrina (Piretox)			
Pentacloronitrobenceno (Quintozeno)			
Otros:			

Antecedentes Personales No Patológicos

Fuma: Si [] Tiempo _____ # de cigarrillos/día: _____

No [] si era fumador, años de fumador _____ hace cuanto lo dejó: _____

Ingiere bebidas alcohólicas: Si [] Tiempo _____ Cantidad: _____ ml Tipo de bebida: _____

No [] si bebía, cuanto tiempo bebió _____ cuándo lo dejó: _____

Drogas: Si [] Tiempo _____ Cantidad: _____ Tipo de droga: _____

No [] si usaba drogas, cuanto tiempo las utilizó _____ cuándo lo dejó: _____

Antecedentes Personales Patológicos (Marcar con una ✓ y especificar enfrente tiempo de diagnóstico y si recibe tratamiento)

Asma Si [] No []

Rinitis alérgica Si [] No []

Cáncer Si [] No []

Tuberculosis Si [] No []

Diabetes Si [] No []

VIH/SIDA Si [] No []

Hipertensión arterial Si [] No []

Otros: _____

Transfusiones sanguíneas: Si ☐ No ☐

Interrogatorio del Sistema Inmunológico

Vacunas:

- ☐ Esquema completo
☐ No recibió ninguna
☐ Esquema incompleto

BCG (<i>Tuberculosis</i>)
Sabin (<i>Poliomielitis</i>)
DPT (<i>Difteria, Tos Ferina y Tétanos</i>)
Hib (<i>Haemophilus influenza Tipo b.</i>)
SRP (<i>Sarampión, Rubeola y Paperas</i>)
Td (<i>Toxide tetánico y diftérico</i>)
Antihepatitis B
Neumococo

Alergias:

- | | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Anestesia <input type="checkbox"/> | Lana <input type="checkbox"/> | Picadura de abeja <input type="checkbox"/> |
| Antiácidos <input type="checkbox"/> | Laxantes <input type="checkbox"/> | Polen <input type="checkbox"/> |
| Cloro <input type="checkbox"/> | Mariscos <input type="checkbox"/> | Polvo <input type="checkbox"/> |
| Corticoides <input type="checkbox"/> | Nueces <input type="checkbox"/> | Salicilatos <input type="checkbox"/> |
| Huevo <input type="checkbox"/> | Penicilina <input type="checkbox"/> | |

Otras: _____

Nivel Socioeconómico (marca con una √ la cantidad correspondiente para cada bien que posees)

Bienes	0	1	2	3	4
Focos					
TV a color					
Escolaridad del Jefe de Familia		Primaria Secundaria	Técnica Preparatoria	Licenciatura	Posgrado
Automóvil					
Tipo de Piso	Tierra o Cemento				
DVD					
Microondas					
Baños					
Computadora					
Regadera					
Estufa					
Servicio doméstico					
Cuartos					

Exploración físicaSignos Vitales:

Frecuencia Cardíaca ____/min. Frecuencia Respiratoria ____/min. Presión Arterial ____/____ mmHg

Temperatura ____ °C. Peso ____ Kg. Estatura ____ m. Índice de Masa Corporal ____ kg/m²

Examen Físico Segmentario		Alteraciones	Observaciones (Tacha las alteraciones)
Cabeza		Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Adenopatías. Ojos: Inyección Conjuntival. Oídos: Otitis Externa, Otitis Media Nariz: Rinitis Boca: Faringitis.
Cuello		Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Inspección: Ganglios Linfáticos (Inflamación), Ingurgitación yugular Palpación y Percusión: Linfáticos (Aumento de Tamaño, Dolor, Textura, Forma, Consistencia)
Tórax	General	Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Masas, Inflamación, Adenopatías.
	Pulmones	Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Inspección: Asimetría, Empleo de Músculos Accesorios, Tiraje Costal. Percusión: Matidez, Timpanismo, Hipersonoridad. Auscultación: Roncus, Sibilancia, Estertores, Crepitos, Pectoriloquia, Broncofonía, Egofonía, Roce Pleural.
	Corazón	Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Auscultación: Bradicardia, Taquicardia, Soplos, Chasquidos, Rose Pericárdico.
Abdomen	General	Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Inspección: Talangiectasias Aracniformes, Globoso, Excavado, Organomegalias Auscultación: Ruidos de Lucha, Ausencia de Ruidos, Borboteo. Percusión: Zonas de Matidez. Palpación: Oleada ascítica
Extremidades superiores		Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Edema, Cicatrices, Movilidad, Sensibilidad, Fuerza, Deformidades, Inflamación.
Extremidades inferiores		Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Edema, Cicatrices, Movilidad, Sensibilidad, Fuerza, Deformidades, Inflamación.
Piel y mucosas		Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Maculas, pápulas, pústulas, edema, eritema, enantema, mancha, cicatriz Sitio

ANEXO C. Oficio institucional de permiso del H. Ayuntamiento de Calimaya



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Química

Toluca, Estado de México a 16 de Marzo de 2018.

C. ARMANDO LEVI TORRES ARANGUREN
PRESIDENTE MUNICIPAL.
AYUNTAMIENTO DE CALIMAYA

PRESENTE

Dentro de las actividades sustanciales que se realizan en la Universidad Autónoma del Estado de México, es la investigación, en este sentido le comento que en la Facultad de Química se está llevando a cabo un proyecto titulado "Inmunotoxicidad y estrés oxidativo en agricultores expuestos crónicamente a plaguicidas en Calimaya Estado de México", ya que se tiene la información del uso de plaguicidas para mejorar los cultivos de papa en esa zona. Siendo que Calimaya ocupa el tercer lugar Estatal, como el Municipio con mayor cantidad de unidades productoras de papa, existe la preocupación por indagar el estado de salud general de los agricultores, por la posible exposición a éstos compuestos.

Por lo cual, nos dirigimos a usted para solicitar su invaluable apoyo para que la M. C. **Helen's Irais Sánchez Mendoza**, alumna del segundo semestre del posgrado de la Maestría en Ciencias Ambientales, que se imparte en la Facultad de Química de la UAEM, pueda realizar dicha investigación. Para el logro de este propósito se requiere realizar una exploración física a los trabajadores que voluntariamente deseen participar, aplicar un cuestionario y tomar una muestra sanguínea.

Se anexa, resumen del protocolo de investigación y carta de consentimiento informado para reclutar a los voluntarios. Cabe aclarar que al término de la investigación se hará entrega de los resultados obtenidos, al personal participante y al Ayuntamiento a su dígito cargo.

Agradeciendo de antemano su apoyo, nos despedimos con el envío de un cordial saludo y nos ponemos a su disposición para cualquier aclaración al respecto.



AYUNTAMIENTO
CALIMAYA
GOBIERNO MUNICIPAL



23 MAR 2018

SECRETARIA PARTICULAR

RECIBE: bauro HORA: 10:57hrs

Facultad de Química de la UAEM,
Paseo Colón Esq. Paseo Toluca,
Col. Residencial Colón, C.P. 50120.
Toluca, Estado de México
Tel. (722) 2175109 / 2173890
fqm@uaemex.mx




Universidad Autónoma del Estado de México
 Facultad de Química

ATENTAMENTE,
 PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
 "Año del 190 aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"


Helen's Irais Sánchez Mendoza
 Alumna del PMCA


Dra. Araceli Amaya Chávez
 Corresponsable de la investigación


Dra. María del Socorro Camarillo Romero
 Corresponsable de la investigación


Dr. Juan Carlos Sánchez Meza
 Corresponsable de la investigación


 U.A.E.M.
 FACULTAD DE QUÍMICA
 DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS

c.c.p. Dra. Patricia Balderas Hernández
 Coordinadora de Investigación y Estudios Avanzados FQ.
 Archivo




Facultad de Química de la UAEM,
 Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan,
 Col. Residencial Colón. C.P. 50120.
 Toluca, Estado de México
 Tel. (722) 2475109 / 2473890
 fquim@uaemex.mx